

Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des viralen Antiapoptoseproteins P35 und des Caspasenadaptormoleküls Apaf-1

Vorgelegt von
Lebensmittelchemiker
David Takramah

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. H.- J. Stan
Berichter: Prof. Dr. med. G. Häcker

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 08. 02. 2002

Berlin 2002
D 83

Diese Arbeit ist meinen Eltern Rosemarie und Joseph Takramah, meiner Schwester Gladys Takramah und meinen Grosseltern Katharina und Georg Encke gewidmet.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Themenkomplex aus der biomedizinischen Forschung und wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München durchgeführt.

Für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit möchte ich mich im besonderen bei Herrn Professor Dr. H.- J. Stan vom Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin bedanken, der darüberhinaus den Fortgang der Arbeiten begleitete und unterstützte und stets für konstruktive wissenschaftliche Diskussionen zur Verfügung stand.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. G. Häcker für die Unterstützung bei der Einarbeitung in das Gebiet der Biomedizin. Die vielen wissenschaftlichen Gespräche mit ihm haben nicht zuletzt dazu beigetragen, mein Wissen zu erweitern und mein Interesse an der Molekularbiologie zu vertiefen.

Den Herren Professor Dr. Wagner, Professor Dr. Holzmann, Professor Dr. Pfeffer und ihren Mitarbeitern möchte ich ebenfalls für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit danken.

Allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe möchte ich für die Zusammenarbeit und Unterstützung und für die sehr freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre danken: Juliane Vier, Barbara Seiffert, Monika Gerhard, Silke Fischer, Claudia Schwarz, Christine Fürmann, Corina Anders, Catharina Müller-Thomas, Astrid Mack, Wolfgang Wöhrle, Georg Linsinger und allen anderen ehemaligen und neuen Mitarbeitern.

Last but not least möchte ich all jenen danken, die mir während meines Studiums in Berlin und während meiner Doktorandenzeit in München durch Zuspruch und Ermutigung zur Seite standen: Elke Maneke, Randolph Radke, Dr. O. Encke, Torsten Encke, Theodore Atiedu und anderen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	4

Zusammenfassung 5

1 Einführung 7

1. 1	Molekularbiologische und biochemische Methoden in der Lebensmittelchemie	7
1. 2	Theoretische Grundlagen der Apoptose	14
1. 2. 1	Definition	14
1. 2. 2	Geschichtliches	15
1. 2. 3	Merkmale der Apoptose	16
1. 2. 4	Molekulare Mechanismen der Apoptose	17
1. 2. 5	Anwendungen der Apoptose	19
1. 2. 5. 1	Apoptose während der Entwicklung, zur Aufrechterhaltung der Homöostase und als Verteidigung gegen toxische Substanzen	19
1. 2. 5. 2	Apoptose bei viralen und bakteriellen Infektionen	20
1. 2. 6	Apoptoseinhibition durch Baculoviren	22
1. 2. 6. 1	Apoptoseinhibition durch virales P35-Protein	23
1. 2. 7	Das Caspasenadaptormolekül Apaf-1	25
1. 3	Problemstellung	28
1. 3. 1	Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Baculovirusproteins Ac-P35	28
1. 3. 2.	Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Caspasenadaptormoleküls Apaf-1	31

2 Ergebnisse 35

2. 1	Interaktionsstudien mit dem Interaction Trap-System	35
2. 1. 1	Ac-P35 interagiert mit einer RNA-Polymerase II-Untereinheit, hRPB11	35
2. 1. 2	Ac-P35 und hRPB11 bilden Homodimere	43
2. 1. 3	Die CARD-Domäne von Apaf-1 interagiert mit einem Teil des humanen Proteins hVPS41	46
2. 1. 4	Übersicht der durchgeführten Ac-P35- und Apaf-1-Interaction Trap-Screens	51

2. 2	Ko-Lokalisation von Ac-P35 und hRPB11 in humanen Zellen	52
2. 3	Ac-P35 und hRPB11 haben einen Einfluss auf die Aktivität humaner Promotoren	54
2. 4	Homologien in der Primärsequenz von Ac-P35 und hRPB3	56
3	Diskussion	59
3. 1	Übersicht	59
3. 2	Dimerisierung des P35-Proteins	60
3. 2. 1	Homodimerisierung von Ac-P35	60
3. 2. 2	Zelluläres P35-Protein: Homodimerisierung und Interaktion mit Ac-P35?	63
3. 2. 3	Die Rolle der N- und C-terminalen Anteile bei der Dimerisierung von Ac-P35	66
3. 3	Ac-P35 interagiert mit einer Komponente der humanen RNA-Polymerase II	69
3. 3. 1	Mögliche Konsequenzen der Interaktion von Ac-P35 mit Komponenten des Transkriptionsapparates	71
3. 4	Ac-P35 und hRPB11 haben einen Einfluss auf die Transkription	76
3. 5	Homodimerisierung des hRPB11-Proteins	78
3. 6	Die Aminosäuresequenzen von Ac-P35 und hRPB3 sind einander ähnlich	79
3. 7	Die CARD-Domäne von Apaf-1 interagiert mit einem Fragment des hVPS41-Proteins	81
4	Material und Methoden	85
4. 1	Material	85
4. 1. 1	Chemikalien, Biochemikalien	85
4. 1. 2	Antikörper	87
4. 1. 3	Enzyme	88
4. 1. 4	Plasmide/Vektoren	88
4. 1. 4. 1	Interaction Trap-Vektoren/Plasmide	88
4. 1. 4. 2	Sonstige Ausgangsplasmide und –vektoren	92
4. 1. 4. 3	Plasmide für Reporter-Assays	92
4. 1. 4. 3. 1	Reporterplasmide	92
4. 1. 4. 3. 2	Expressionsplasmide	93
4. 1. 5	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	94
4. 1. 6	Geräte	95
4. 1. 7	Sonstige Materialien	96
4. 1. 8	Lösungen, Stammlösungen und Puffer	97

4. 1. 9	Medien	99
4. 1. 9. 1	Medien für die Bakterienkultur	99
4. 1. 9. 2	Medien für die Hefekultur (<i>S. cerevisiae</i> EGY 48/pSH18-34)	99
4. 1. 9. 3	Medien für die Zellkultur	100
4. 1. 10	Mikroorganismen und Zelllinien	101
4. 1. 10. 1	Bakterien	101
4. 1. 10. 2	Hefen	101
4. 1. 10. 3	Zelllinien	103
4. 2	Methoden	104
4. 2. 1	Molekularbiologische und biochemische Standardmethoden	104
4. 2. 1. 1	Fällen und Reinigung von DNA	104
4. 2. 1. 2	Präparation von DNA	105
4. 2. 1. 2. 1	Präparation im kleinen Maßstab (Minipräparationen)	105
4. 2. 1. 2. 2	Präparation im großen Maßstab (Midi- oder Maxipräparationen)	106
4. 2. 1. 3	Konzentrationsbestimmung von DNA	107
4. 2. 1. 4	Transformation von Bakterien	107
4. 2. 1. 4. 1	Herstellen kompetenter Bakterien	109
4. 2. 1. 5	Agarose-Gelelektrophorese	109
4. 2. 1. 6	DNA-Amplifikation mittels PCR	111
4. 2. 1. 7	DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen	112
4. 2. 1. 8	Klenow- und T4 DNA-Polymerase	113
4. 2. 1. 9	Dephosphorylierung von DNA	114
4. 2. 1. 10	Ligation von DNA-Molekülen	114
4. 2. 1. 11	Klonieren von DNA-Fragmenten	115
4. 2. 1. 12	Analyse von DNA-Sequenzen	117
4. 2. 1. 13	Western-Blotting	119
4. 2. 1. 14	Allgemeine Zellkulturtechnik	120
4. 2. 1. 15	Transfektion von DNA in Zellen	121
4. 2. 2	Spezielle molekularbiologische Methoden	123
4. 2. 2. 1	Das Interaction Trap-System	123
4. 2. 2. 1. 1	Theoretische Grundlagen	123
4. 2. 2. 1. 2	Durchführung des Interaction Trap-Systems	127
4. 2. 2. 2	Lokalisationsstudien	129
4. 2. 2. 3	Das Luciferase Reporter-System	130
5.	Literatur	133
6.	Lebenslauf	146

Verzeichnis der Abkürzungen

Es werden alle Abkürzungen aufgeführt, die im vorliegenden Text verwendet werden mit Ausnahme von einigen allgemein bekannten Abkürzungen wie z. B. DNA und RNA für Desoxyribonuclein- und Ribonucleinsäure, die Abkürzungen der Nucleosid- und Desoxynucleosid-triphosphate, die Ein- und Dreibuchstaben-Codes der proteinogenen Aminosäuren, bekannte (SI-) Einheiten wie U für Spannung, A für Ampere und g für Erdbeschleunigung sowie alle weiteren bekannten Abkürzungen, z. B. UV für ultraviolett (UV-Licht) oder ZNS für zentrales Nervensystem.

AcNPV	<i>Autographa californica</i> Nuclear Polyhedrosis Virus (von manchen Autoren auch als AcMNPV (<i>A. californica</i> Multinucleocapsid NPV) bezeichnet
Ac-P35	P35-Protein aus AcNPV
AD	Aktivierungsdomäne
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
Amp ^r	Bakterielles β -Lactamase-Gen
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
AP-1	Activating Protein-1
AP-3	Adaptor Protein Complex-3
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure, Antisense (bei Primern)
B42	Transkriptionsaktivierendes Polypeptid aus <i>Escherichia coli</i>
Bax	Bcl-2 Associated x Protein
Bcl-2	B-Cell Leukemia/Lymphoma 2
Bid	BH3 (Bcl-2 Homology-3 Domain) Interacting Domain Death Agonist
BIR	Baculovirus IAP-Repeat
BmNPV	<i>Bombyx mori</i> Nuclear Polyhedrosis Virus
Bm-P35	P35-Protein aus BmNPV
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
Bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin
CAD	Caspase-Activated DNase
CARD	Caspase Recruiting Domain
CD95 (Fas/Apo-1)	Cluster of Differentiation 95
CD95L	CD95-Ligand
cDNA	Complementary DNA
CED	Cell Death Defective
CMV	Cytomegalovirus
c-P35	Zelluläres P35-Protein
C-P35	C-Terminus von Ac-P35
CpGV	<i>Cydia pomonella</i> Granulosis Virus

Cp-IAP	IAP-Proteine aus CpGV
CrmA	Cytokine Response Modifier A
<i>CYC1</i>	Gen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , das für Iso-1-Cytochrome c codiert
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DEAE	Diethylaminoethanol
DFP	DNA-Fragmenting Factor
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with Low Isoelectric Point
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosid-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E1A Protein	Early Region 1a Protein
E1B 19K Protein	Early Region 1b 19 kDa Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
ELAM	Endothelial Cell-Leukocyte Adhesion Molecule (E-Selectin)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EST	Expressed Sequence Tag
FADD	Fas-Associated Death Domain Containing Protein
FKS	Fötales Kälberserum
FLICE	FADD-Like Interleukin-1 β -Converting Enzyme
FLIP	FLICE Inhibitory Protein
cFLIP	Cellular FLICE Inhibitory Protein
vFLIP	Viral FLICE Inhibitory Protein
GABI	G β -like Protein Associating with β_7 Integrin
<i>GAL1</i>	Galactokinase-Gen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>GAL4</i>	Gen des Transkriptionsfaktors Gal4 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GFP	Green Fluorescent Protein
GlutaMAX-I™	L-Alanyl-L-Glutamin
GST	Gluthation-S-Transferase
Hbx	Hepatitis-B-Virus-X-Gen
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
<i>HIS3</i>	Imidazolglycerol-phosphat-Dehydratase-Gen aus <i>S. cerevisiae</i>
Hsp-70	Heat Shock Protein 70
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
Il-2	Interleukin-2
Il-8	Interleukin-8
kBp	Kilobasenpaare
KCM-Puffer	Kalium-Calcium-Magnesium-Puffer
kDa	Kilodalton
LacZ	β -Galactosidase-Gen
LB	Luria Bertani
<i>LEU2</i>	β -Isopropyl-Dehydrogenase-Gen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
LexA	Repressorprotein aus <i>Escherichia coli</i>
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
Luc	Luciferase-Gen
MDa	Megadalton

MHC I	Major Histocompatibility Complex I
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N-P35	N-Terminus von Ac-P35
NLS	Nukleus-Lokalisationssequenz
OD	Optische Dichte
Op-IAP	IAP-Proteine aus OpNPV
OpNPV	<i>Orgyia pseudotsugata</i> Nuclear Polyhedrosis Virus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
Pfu	Bakterium <i>Pyrococcus furiosus</i>
RIA	Radioimmunoassay
RLU	Relative Light Units
RPB	RNA-Polymerase B(II)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNAse	Ribonuklease
RSL	Reactive Site Loop
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfate
Smac	Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase
SP6	Bakteriophage SP6
T3	Bakteriophage T3
T4	Bakteriophage T4
T7	Bakteriophage T7
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	(Allgemeiner) Transkriptionsfaktor
TNF	Tumor Nekrosefaktor
TRADD	TNF Receptor 1-Associated Protein with Death Domain
<i>TRP1</i>	N-(5'-phospho-ribosyl)-anthranilat-Isomerase-Gen aus <i>S. cerevisiae</i>
TSS	Transformation and Storage Solution
u	unit (Enzymeinheit)
UAS	Upstream Activating Sequence
<i>URA3</i>	Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase-Gen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Vpr	Virus Protein R
VPS (-Protein)	Vacuolar Protein Sorting (-Protein)
v/v	Volume per volume
WAIT-1	WD Protein Associating with Integrin Cytoplasmic Tails-1
WNT	Wingless-Type Mouse Mammary Tumour Virus Integration Site
w/v	Weight per volume
X-Gal	X-Galactopyranosid (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Struktur von Apaf-1	25
Abb. 2:	Apaf-1-abhängiger Apoptose-Signaltransduktionsweg	27
Abb. 3:	Ein Antiserum gegen virales P35 erkennt virales P35 in Vertebratenzellen sowie ein zelluläres Protein, c-P35	29
Abb. 4:	Leserahmen im Fusionsplasmid pLexA/p35	36
Abb. 5:	Expression des LexA/P35-Proteins in <i>S. cerev.</i> EGY 48/pJK103	36
Abb. 6:	Interaction Trap-Screen (Screen-Nr. 5 _{12,1}). Selektion auf <i>LEU2</i> - und <i>LacZ</i> -Reporterogenaktivität auf UHWL ⁻ -X-Gal-Medium	37
Abb. 7:	Überprüfung der Spezifität der Interaktionen auf UHWL ⁻ -X-Gal-Medium (Screen 5 _{12,1})	39
Abb. 8:	cDNA-Sequenz von K64.4	40
Abb. 9:	Proteinsequenz von hRPB11	40
Abb. 10:	hRPB11 interagiert spezifisch mit Ac-P35	42
Abb. 11:	Die N-terminale Hälfte von Ac-P35 interagiert mit hRPB11	43
Abb. 12:	Ac-P35 bildet Homodimere	44
Abb. 13:	N- und C-P35 interagieren in unterschiedlicher Stärke mit Ac-P35	44
Abb. 14:	N-P35 interagiert mit C-P35	45
Abb. 15:	Homodimerisierung von hRPB11	45
Abb. 16:	Expression des LexA/CARD(Apaf-1)-Fusionsproteins in <i>S. cerev.</i> EGY 48/pSH18-34	47
Abb. 17:	Überprüfung der Spezifität der Interaktionen auf UHWL ⁻ -X-Gal-Medium (Screen CARD ₁ /CARD ₂)	48
Abb. 18:	cDNA-Teilsequenz von hVPS41	49
Abb. 19:	Intrazelluläre Lokalisation von Ac-P35 und hRPB11	53
Abb. 20:	Ac-P35 und hRPB11 regulieren die Promotoraktivität in LoVo-Zellen	55
Abb. 21:	Vergleich der Aminosäuresequenzen von P35 und RPB3 aus verschiedenen Organismen	58
Abb. 22:	Dimerisierung von Ac-P35	67
Abb. 23:	Transkriptionskontrolle durch basale und nicht-basale Transkriptionsfaktoren	124
Abb. 24:	Funktionsprinzip des Interaction Trap-Systems	126

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Vergleich von homozygoten Apaf-1- und Caspase-9-knockout-Mäusen	34
Tab. 2:	Übersicht der Ac-P35- und Apaf-1-Interaction Trap-Screens	51
Tab. 3:	Übersicht der durchgeführten Promotorstudien	57
Tab. 4:	Interaktionen der Ac-P35-Anteile	66

Zusammenfassung

Apoptose ist eine physiologische Form des Zelltods, bei dem durch Signaltransduktion in einem intrazellulären Weg der Tod der Zelle aktiv infolge der proteolytischen Aktivität spezialisierter Enzyme, der sog. Caspasen, herbeigeführt wird. Der Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Suche nach und Charakterisierung von Interaktionspartnern zweier wichtiger Regulatoren der Apoptose: 1. des Proteins P35 aus dem Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (Ac-P35-Protein) und des Caspasenadaptermoleküls Apaf-1. Ac-P35 ist ein effektiver Apoptoseinhibitor in verschiedenen Organismen wie z. B. in Nematoden, Insekten und im Menschen. Seine antiapoptotische Eigenschaft ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Inhibition der Caspasen zurückzuführen.

1. Experimente an Vertebratenzellen, die deutliche Hinweise auf die Existenz eines zellulären P35-Homologs, das mit viralem P35 interagiert und möglicherweise eine Funktion während der Apoptose besitzt, aufzeigten, waren der Ausgangspunkt dieser Aufgabenstellung. Das Ziel war es, das vermutete zelluläre P35-Homolog zu klonieren und funktionell und strukturell zu charakterisieren.

Interaktionspartner wurden mit einem System zur Darstellung von Protein-Protein-Interaktion (sog. Yeast Two-Hybrid System) in einer Genbank gesucht. Im gleichen System wurden spezifisch Interaktionen von Proteinen überprüft.

Das Ziel, ein zelluläres Homolog von Ac-P35 zu finden und zu charakterisieren, konnte nicht erreicht werden. Statt dessen wurde eine Untereinheit der humanen RNA-Polymerase II, hRPB11, als spezifischer Interaktionspartner von Ac-P35 identifiziert. In weiteren Untersuchungen wurde dargestellt, daß Ac-P35 nach Expression in menschlichen Zellen auch im Kern lokalisiert ist.

Die Interaktion mit hRPB11 und die nukleäre Lokalisation ließen darauf schließen, dass Ac-P35 an Transkriptionsvorgängen in infizierten Zellen beteiligt sein könnte. Mittels Promoterstudien in menschlichen Zellen wurde gezeigt, dass Ac-P35 und sein Interaktionspartner hRPB11 die Aktivität humaner Promotoren stimulieren konnten. Dieses Ergebnis legt den Schluß nahe, dass Ac-P35 in der Lage ist, ein bereits seit einiger Zeit bekanntes Phänomen, das Abschalten der Proteinsynthese in Ac-P35-infizierten Insektenzellen, durch Beeinflussung des zellulären Transkriptionsapparates zu induzieren.

Eine Homodimerisierung von Ac-P35 wurde weiterhin nachgewiesen; die mögliche Relevanz dieser Eigenschaft wird diskutiert.

hRPB11 interagiert im Holoenzym der RNA Polymerase mit einer weiteren Untereinheit der humanen RNA-Polymerase II, der Untereinheit hRPB3. Der Befund, dass hRPB11 auch mit Ac-P35 interagiert, machte die Frage interessant, ob hRPB3 und Ac-P35 strukturelle Gemeinsamkeiten besitzen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von P35- und RPB3-Proteinen aus verschiedenen Spezies ließ klare Anhäufungen von identischen und ähnlichen Aminosäuren erkennen, so dass diese Proteine als einander ähnlich eingestuft wurden. Dies hat möglicherweise Konsequenzen für die Regulation der Transkription durch Ac-P35.

2. Der zweite Teil der Aufgabenstellung umfasste die Suche und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Caspasenadaptormoleküls Apaf-1, dessen zentrale Bedeutung in manchen Wegen der Apoptose eine feine Regulation durch interagierende Proteine nahelegte. Die zwei bekannten funktionellen Domänen von Apaf-1, CARD und WD-40 wurden im Interaction Trap-System eingesetzt. Es konnte kein Interaktionspartner der WD-40-Domäne gefunden werden, jedoch interagierte die CARD-Domäne mit dem C-terminalen Teil des humanen Proteins hVPS41. Über die Funktion dieses Proteins ist nicht viel bekannt. Es wird vermutet, dass es eine Rolle beim intrazellulären Proteintransport spielt, in dem es an der Bildung von Transportvesikeln am Golgi-Apparat beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass hVPS41 direkt mit Apaf-1 am Golgi-Apparat interagiert und für den intrazellulären Transport von Apaf-1 verantwortlich ist. Mögliche pro- oder antiapoptotische Funktionen von hVPS41, die aufgrund der Transporteigenschaften von hVPS41 und der vermuteten Interaktion zwischen vollständigem hVPS41- und Apaf-1-Protein resultieren, werden diskutiert.

1. Einführung

In diesem Abschnitt werden drei Themengebiete behandelt. Im ersten Teil werden die verschiedenen biochemischen und molekularbiologischen Methoden sowie deren Anwendungen in der amtlichen Lebensmittelüberwachung vorgestellt. Dabei wird weiter diskutiert, inwieweit Themen und Methoden aus der Biochemie und Molekularbiologie für die Lebensmittelchemie von Bedeutung sind. Als Nächstes werden die theoretischen Grundlagen der Apoptose behandelt und die Eigenschaften und Funktionen des viralen Apoptoseinhibitors P35 sowie die des Caspasenadaptormoleküls Apaf-1 beschrieben. Im dritten und letzten Teilabschnitt, der Problemstellung, werden schließlich die Überlegungen ausführlich dargelegt, die zur Formulierung der Aufgabenstellung führten.

1. 1 Molekularbiologische und biochemische Methoden in der Lebensmittelchemie

Die Lebensmittelchemie¹ ist eine selbstständige naturwissenschaftliche Disziplin innerhalb der Chemie. Sie befasst sich mit den Eigenschaften und der stofflichen Zusammensetzung der Lebensmittel sowie mit ihren Veränderungen bzw. chemischen Umwandlungen.

Alle Lebensmittel sind grundsätzlich natürlichen Ursprungs und so ist das Studium der Biochemie der in Lebensmitteln vorhandenen, ernährungsphysiologisch relevanten Stoffe sowie deren Verwertung im menschlichen Körper ein wichtiges Teilgebiet in der lebensmittelchemischen Ausbildung. Im weiteren ist das Verständnis aller strukturellen, physikalischen und chemischen Vorgänge, die bei der Erzeugung und Gewinnung der Lebensmittelrohstoffe sowie bei ihrer Lagerung, Zubereitung und Verarbeitung stattfinden, Grundlage für die ständige Verbesserung der Qualität der Lebensmittel und der technologischen Verfahren bei ihrer Herstellung.

Eine der wichtigsten Aufgaben des Lebensmittelchemikers besteht in der Erarbeitung und Anwendung chemisch-analytischer, biochemischer und mikrobiologischer – und in neuerer Zeit

¹ Historisches: Nach der Gründung des „Kaiserlichen Gesundheitsamtes“ im Jahre 1876 wurde am 14. Mai 1879 das erste deutsche Lebensmittelgesetz verkündet. 1894 wurde dann eine spezielle Prüfungsordnung für Nahrungsmittelchemiker erlassen und Lehrstühle für Lebensmittelchemie errichtet.

auch molekularbiologischer – Analysemethoden, um die Reinheit, Qualität und Identität der Lebensmittel zu gewährleisten.

In Deutschland ist es die Aufgabe der amtlichen Lebensmittelüberwachung darüber zu wachen, dass alle Rechtsvorschriften im Verkehr mit Lebensmitteln, Kosmetika, Tabakerzeugnissen und Bedarfsgegenständen eingehalten werden, Gefahren vom Verbraucher abgewendet und Verstöße gegen die geltenden Rechtsvorschriften geahndet werden. Eine besondere Bedeutung bei der Durchführung des Verbraucherschutzes kommt dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz zu. Dieses für Fragen der Lebensmittelsicherheit zuständige Institut veröffentlicht eine amtliche Sammlung von Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Zusatzstoffen, kosmetischen Mitteln, Tabakerzeugnissen und Bedarfsgegenständen. Diese als „Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG“ bezeichnete Methodensammlung ist für die Landesuntersuchungsämter verbindlich und wird ständig aktualisiert. Neben chemischen und instrumentellen Analysemethoden finden sich „klassische“ biochemische Untersuchungsverfahren wie z. B. elektrophoretische und enzymatische Verfahren, aber auch neuere, auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruhende Methoden, die speziell für die Bestimmung von gentechnisch veränderter DNA und von mikrobiellen Kontaminationen in Lebensmitteln erarbeitet worden sind. Im Folgenden sollen nun einige biochemische und molekularbiologische Methoden vorgestellt werden, die bei der amtlichen Untersuchung von Lebensmitteln eingesetzt werden (alle nachfolgend beschriebenen Methoden entstammen der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG“, Stand: Juli 2000):

Elektrophoretische Verfahren:

Bei den elektrophoretischen Verfahren werden die zu bestimmenden Proteine in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungseigenschaften in einem Trägermaterial getrennt. Es werden verschiedene Arten der elektrophoretischen Analyse eingesetzt:

- *Standard-Elektrophorese(PAGE)*

Bei der Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrer unterschiedlichen Nettoladung, Molekülgröße und -form aufgetrennt.

- *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Hier werden die Proteine in einem Polyacrylamidgel und in Anwesenheit von SDS aufgrund eines Molekularsiebeffektes nach ihrer Größe getrennt.

- Isoelektrische Fokussierung (PAGIF)

Die Auftrennung der Probenproteine erfolgt nach ihren unterschiedlichen isoelektrischen Punkten.

Diese Methoden werden bei unterschiedlichen Lebensmittelgruppen angewendet, wobei die Probenproteine vor der elektrophoretischen Trennung aus der Lebensmittelmatrix isoliert werden. Die elektrophoretische Analyse wird angewendet zum Nachweis der Tierart bei Milch, Milchprodukten und Käse, zur Bestimmung des Molkenprotein- und Caseinanteils am Gesamtprotein von Milch- und Milchprodukten sowie zum Nachweis der Tierart bei nativem und erhitztem Muskelfleisch

Immunochemische Verfahren:

Grundlage der Immunochemischen Verfahren ist die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper besteht in einer nichtkovalenten Bindung, dem Immunkomplex, aufgrund der sterisch passenden Konfiguration des Antigens zu einem bestimmten Teil (der sogenannten hypervariablen Region) des Antikörpers (Schwedt, *Taschenatlas der Analytik*, Thieme 1992).

Es werden folgende Methoden eingesetzt:

- Immundiffusion nach Ouchterlony

Hierbei werden die Probenproteine (Antigene) sowie die Immunglobuline des Antiserums zunächst in einem Agarosegel mittels Gegenstromelektrophorese aufgetrennt, wobei die Antigene in Richtung Anode, die Antikörper des Serums in Richtung Kathode wandern. Nach dem Stehenlassen in einer feuchten Kammer über Nacht bilden sich Präzipitationslinien aus, die dadurch entstehen, dass Antigene und Antikörper aufeinander zu diffundieren und ein Präzipitat bilden.

- Doppelte Geldiffusion nach Ouchterlony

Bei der doppelten Geldiffusion diffundieren Probenproteine und Antikörperproteine in einem Agarosegel gegeneinander und bilden im Äquivalenzpunkt ein Präzipitat. Anhand der Präzipitationslinien von benachbart aufgetragenen Probelösungen kann zudem die Antigenverwandtschaft ermittelt werden (z. B. „Spornbildung“ bei Teilidentität). Zur Absicherung des Ergebnisses wird die Immunelektrophorese nach Graber und Williams eingesetzt, bei der eine Auftrennung der einzelnen Probenproteine erfolgt. Nach der elektrophoretischen Trennung wird eine im Gel vorgeschchnittene Rinne längs der Wanderungsrichtung der Proteine ausgehoben und mit Antiserum ausgefüllt. Die nachfolgende

Diffusion erzeugt wie oben Fällungslinien, die als Bögen in Erscheinung treten. Aufgrund der Wanderungsstrecke, der Form und Intensität der Bögen lässt sich die Identität mit dem gesuchten Protein sichern. Im Idealfall liegen die identischen Proteinbanden von Probe und Kontrolle spiegelbildlich gegenüber.

Diese Immundiffusionstechniken werden u. a. angewendet beim Nachweis der alkohollöslichen Fraktion von Getreideproteinen („Gliadin“) in Lebensmitteln, zum Nachweis von Proteinen in Fleischerzeugnissen, Backwaren (einschließlich Brot und glutenfreien Backwaren), in Süßwaren und Kakaoerzeugnissen sowie zum Nachweis von Enzym- und Rohfruchtproteinen in Bier.

- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Der kompetitive ELISA beruht auf der konkurrierenden Komplexbildung des Analyten als natürlichem Antigen und einem enzymmarkierten Antigen mit den an einer festen Oberfläche immobilisierten Antikörpermolekülen. Die Menge des gebundenen enzymmarkierten Antigens kann anhand des Substratumsatzes photometrisch gemessen werden und ist der Analytkonzentration in der Probe umgekehrt proportional. Beim *Radioimmunoassay (RIA)* wird zur Markierung des Antigens anstelle eines Enzyms ein radioaktives Isotop (z. B. ^3H , ^{32}P und ^{35}S) verwendet.

Beim ELISA nach dem *Sandwich-Prinzip* wird das Probenantigen an den immobilisierten Antikörpermolekülen gebunden und durch Zugabe des markierten (z. B. biotinylierten) Antikörpers werden noch freie Epitope des Antigens besetzt. Das markierte Immunglobulin wird mit einem Enzym-Konjugat (z. B. Streptavidin-Peroxidase-Konjugat) und anschließend zusätzlich mit einer Substratlösung inkubiert. Die Menge des gebundenen markierten Antikörpers kann anhand des Substratumsatzes photometrisch gemessen werden und ist der Analytkonzentration in der Probe proportional.

Die ELISA- und RIA-Methoden werden u. a. eingesetzt bei der Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver, der Bestimmung von Chloramphenicol-Rückständen in Milch und in Muskelfleisch, dem Nachweis der Tierart bei erhitztem Fleisch und Fleischerzeugnissen und dem Nachweis von Enzymproteinen und Rohfruchtproteinen (Mais bzw. Reis) in Bier.

Enzymatische Analysen:

Hierbei wird die Probensubstanz spezifisch durch ein Enzym zu einem anderen Produkt umgesetzt. Die Enzymreaktion wird meist im optischen Test mit Dehydrogenase gekoppelt, wobei die Umsetzung eines Coenzym (NAD⁺/NADH oder NADP⁺/NADPH) sich durch photometrische Messung der Extinktionsänderung verfolgen lässt. Die Menge an gebildetem reduziertem bzw. oxidiertem Coenzym ist der Analytmenge proportional. Obwohl der optische Test weit verbreitet ist, sind andere Endproduktsbestimmungen möglich. Beispielsweise lassen sich alle Sauerstoff verbrauchenden Reaktionen mit einer Sauerstoffelektrode verfolgen. So wird Glucose mit dem Enzym Glucoseoxidase bestimmt.

Enzymatische Analysen werden u. a. angewendet bei der Bestimmung des Lactose- und Galactosegehaltes sowie des Gehaltes an L- und D-Milchsäure von Milch und Milchprodukten, ferner bei der Bestimmung des Gehaltes an Sacharose und Glucose in Milchprodukten und bei der Bestimmung des Cholesteringehaltes in Eiern und Eiprodukten. Im Weiteren findet die enzymatische Analyse Anwendung bei der Bestimmung des Glucose-, Fructose- und Saccharosegehaltes, sowie des Citronen- und Äpfelsäuregehaltes in Frucht- und Gemüsesäften, bei der Bestimmung von Lactose in Schokolade und der Bestimmung des Zuckergehaltes in Tomatenketchup und vergleichbaren Erzeugnissen.

Molekularbiologische Analyseverfahren:

Seit dem 15. Mai 1997 regelt die EU-Verordnung 258/97 über neuartige Lebensmittel und Lebensmittelzutaten (Novel-Foods-Verordnung) für alle Mitgliedstaaten verbindlich das Inverkehrbringen neuartiger Lebensmittel. Im Gegensatz zu herkömmlichen Produkten unterliegen diese Lebensmittel einem Anmelde- bzw. Genehmigungsverfahren und müssen zusätzliche Anforderungen an die Kennzeichnung erfüllen. Neuartig sind u. a. Lebensmittel, die bisher in der Europäischen Gemeinschaft noch nicht in nennenswertem Umfang für den menschlichen Verzehr verwendet wurden und gentechnisch veränderte Organismen enthalten oder aus solchen bestehen bzw. aus gentechnisch veränderten Organismen hergestellt wurden, solche jedoch nicht enthalten.

Bereits vor Inkrafttreten der Novel-Foods-Verordnung waren in den Jahren 1996 und 1997 die insektentolerante Maislinie Bt 176 (Novartis, Schweiz) sowie die herbizidtolerante Roundup Ready™-Sojabohne (Monsanto, USA) zum Zweck der Lebensmittelherstellung zugelassen worden (gemäß der EU-Richtlinie über Freisetzen und Inverkehrbringen 90/220/EWG). Die daraus hergestellten Lebensmittel können seither in allen Mitgliedstaaten der Europäischen

Union auf den Markt gebracht werden. Ferner sind in der EU auch Lebensmittelprodukte aus gentechnisch verändertem Raps verkehrsfähig. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass sich in Deutschland mittlerweile eine Reihe von Lebensmitteln im Handel befinden, die Zutaten aus transgenen Sojabohnen und aus transgenem Mais oder Öl aus transgenem Raps enthalten.

Für den Nachweis der genetischen Veränderung in Lebensmitteln sind in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG Methoden enthalten, die den Nachweis von transgenen Kartoffeln und Tomaten sowie von Rohwurst und Joghurt, bei deren Herstellung gentechnisch veränderte Milchsäurebakterien eingesetzt wurden, ermöglichen. Diese Methoden stellen Modellsysteme dar, die bei künftigen Zulassungen der genannten Produkte eingesetzt werden können. Eine Methode zum Nachweis der von der Firma Monsanto in den Verkehr gebrachten glyphosatresistenten Sojabohnen sowie eine Screening-Methode zur Identifizierung transgener Pflanzen, die bestimmte für gentechnische Veränderungen spezifische Kontrollelemente enthalten, sind ebenfalls in die Amtliche Sammlung nach § 35 LMBG aufgenommen worden. Eine Methode zum Nachweis des von der Firma Novartis entwickelten insektentoleranten Maises Bt 176 (Expression eines toxischen Proteins des Bakteriums *Bacillus thuringiensis*) ist inzwischen validiert und vom BgVV zur Aufnahme in die Amtliche Sammlung nach § 35 LMBG eingereicht worden. Ebenso sind Nachweisverfahren für drei weitere im Verkehr befindliche transgene Maissorten (mit den Bezeichnungen MON 810, T 25 und Bt 11) validiert und vom BgVV zur Veröffentlichung eingereicht worden.

Die Methoden zum Nachweis der genetischen Veränderung in den genannten transgenen Pflanzen und Mikroorganismen beruhen auf der Polymerase-Kettenreaktion. Zunächst wird die DNA aus dem Lebensmittel extrahiert und mit Isopropanol gefällt. Nach Überprüfung der DNA-Ausbeute mit der Agarose-Gelelektrophorese wird mittels geeigneter Primer die gesuchte DNA-Sequenz amplifiziert (in der Regel umfasst dieser Abschnitt den Übergang zwischen dem neu eingefügten Gen und einer ebenfalls neu eingefügten regulatorischen Sequenz). Die PCR-Produkte werden anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Längenstandards auf die zu erwartende Größe überprüft. Die Sequenz des amplifizierten DNA-Fragments wird durch weitere Verfahren bestätigt. Eine Möglichkeit besteht darin, dass das Amplifikat durch Restriktionsendonucleasen geschnitten wird, wobei sich für die nachzuweisende Sequenz spezifisch lange Fragmente ergeben. Eine andere Möglichkeit der Bestätigung besteht in der Durchführung einer Hybridisierungsreaktion mit einer markierten DNA-Sonde, nachdem die nach der PCR im Agarosegel aufgetrennte DNA mittels Southern-Blot auf eine Nylonmembran übertragen wurde. Für einen positiven Befund muss das PCR-Amplifikat spezifisch mit der DNA-Sonde hybridisieren. Schließlich bietet die Methode der

Sequenzierung eine weitere Möglichkeit, das amplifizierte DNA-Fragment eindeutig zu identifizieren.

Die PCR-Methode wird im Weiteren zum Nachweis von Mikroorganismen und damit zur Prüfung auf mikrobielle Kontaminationen (z. B. mit Salmonellen) in Lebensmitteln angewendet. Dabei wird zunächst eine Voranreicherung des jeweiligen Mikroorganismus in nichtselektiven und/oder selektiven flüssigen Nährmedien durchgeführt, gefolgt von der Nukleinsäureextraktion und Amplifikation der gesuchten Nukleinsäuresequenz mittels PCR. Zum Schluss erfolgt die Detektion der spezifischen Amplifikate durch Hybridisierung (Southern-Blot-Technik, Slotblot-technik oder durch eine an eine Festphase gebundenen DNA-Sonde) oder ein gleichwertiges Verfahren.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Apoptose und mit zwei Proteinen (bzw. deren Interaktionspartnern), die bei der Apoptose eine wichtige Rolle spielen. Zwar ist die Apoptose als solches nicht Gegenstand der Lebensmittelwissenschaft, jedoch bieten die Methoden, die bei der Erforschung der Apoptose eingesetzt werden, eine gute Möglichkeit für den Lebensmittelchemiker, sich mit grundlegenden Verfahren der Biochemie und der Molekularbiologie in viel intensiverem Maße als bislang üblich vertraut zu machen. Einige der oben genannten molekularbiologischen Standardmethoden wie beispielsweise das Arbeiten mit DNA und Restriktionsendonucleasen sowie der Einsatz der PCR haben inzwischen Eingang in die amtliche Lebensmittelvorschriften gefunden. Auf diese Methoden wird in der vorliegenden Arbeit in einem späteren Abschnitt (Material und Methoden) näher eingegangen werden.

Doch nicht nur biochemische und molekularbiologische Arbeitsmethoden sind für den Lebensmittelchemiker von Bedeutung. Durch die rapide zunehmende Kenntnis molekularer Prozesse in lebenden Organismen werden die Möglichkeiten der Einflussnahme auf Lebensmittel und die Möglichkeiten der technischen Veränderung von Lebensmitteln entsprechend erweitert. Ein Verständnis dieser biologischen Prozesse ist daher auch für den primär analytischen Zugang der Lebensmittelchemie von Vorteil. Für den im Auftrag des Verbraucherschutzes tätigen Lebensmittelchemiker bedeutet dies die Erfordernis, ein umfassendes Grundlagenwissen aus allen relevanten Bereichen sowie ein breites Spektrum an analytischen Methoden zu besitzen, um die Qualität der Lebensmittel und den Schutz der Verbraucher vor gesundheitlichen Gefahren beim Umgang und Verzehr von Lebensmitteln zu gewährleisten. Dennoch kann die Lebensmittelchemie nicht nur als reine Analytik von Lebensmittelinhaltsstoffen verstanden werden, sie umfasst vielmehr auch das Studium aller Faktoren und Einflüsse, die auf das Lebensmittel einwirken. Hierbei sind technologische

Verfahren bei der Lebensmittelherstellung und -verarbeitung ebenso zu zählen wie biochemische, molekularbiologische und mikrobiologische Aspekte, schließlich auch toxikologische, gesundheitliche und rechtliche Aspekte.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Aspekt der biomedizinischen Grundlagenforschung mit Methoden der modernen Biochemie und Molekularbiologie untersucht. Das Studium einer biomedizinischen Fragestellung wird in diesem Zusammenhang als die Chance aufgefasst, Verbindungen zu dem ungemein schnell akkumulierenden Wissen der biologischen Disziplinen zu knüpfen und dieses der Wissenschaft und der Praxis der Lebensmittelchemie zugänglich zu machen.

1. 2 Theoretische Grundlagen der Apoptose

1. 2. 1 Definition

Bevor in den weiteren Ausführungen näher auf die Apoptose und die ihr zugrundeliegenden Mechanismen eingegangen wird, soll an dieser Stelle eine kurze Definition der Apoptose gegeben werden:

Die Apoptose ist eine physiologische Form des Zelltods. Sie wird von vielzelligen Organismen eingesetzt, um in verschiedenen physiologischen und pathologischen Situationen Zellen zu beseitigen, die vom Organismus nicht mehr benötigt werden (Übersicht in Jacobson et al., *Cell* 1997). Die Apoptose kann durch eine Vielzahl von Stimuli, z. B. durch Killerzellen, Glucocorticoide, den Tumor-Nekrose-Faktor oder den Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden. Die *Nekrose* hingegen wird als lokaler Gewebstod in einem lebenden Organismus bezeichnet, der als schwerste Folge einer örtlichen Stoffwechselstörung wie z. B. Sauerstoffmangel oder infolge einer traumatischen Ursache eintritt.

Apoptose ist die häufigste Form des Zelltodes in Säugetieren (Nicholson, *Nature* 2001) und im Gegensatz zur Nekrose kommt es nicht zu Entzündungsreaktionen; die übriggebliebenen Zellbruchstücke, die sog. apoptotischen Körper (s. u.), werden schnell aus dem Gewebe entfernt (Gottlieb, *Biol Signals Recept* 2001).

1. 2. 2 Geschichtliches

Sehr früh in der Geschichte der Biologie wurde Zelltod als ein normaler Prozess im Leben eines multizellulären Organismus beschrieben. Bald nach der Etablierung des Konzepts der Zelle als Baustein der Gewebe und komplexerer Organismen und der Entwicklung des Mikroskops beschrieb Carl Vogt 1842, dass beim Umbau von Knorpelgewebe der Geburtshelferkröte Zellen verschwanden und fand Anhalt dafür, dass diese Zellen starben (Vogt, 1842).

Weitere Arbeiten zum Ende des 19. und Anfang des vorigen Jahrhunderts beschrieben ähnliche Phänomene in der Ontogenese, und der Begriff „programmierter Zelltod“ wurde geprägt, um diese Form des präzise vorhersagbaren Todes von Zellen und Gewebsbezirken zu beschreiben (Lockshin and Williams, *J Insect Physiol* 1965). In der Mitte des vorigen Jahrhunderts wurde bereits entdeckt, dass für manche Formen des programmierten Zelltods RNA- und Proteinsynthese notwendig sind und dass es sich um einen aktiven Prozess handelt (Tata, *Dev Biol* 1966).

Im Jahre 1972 beschrieb John Kerr, dass auch in Zellen des erwachsenen Menschen ein Zelltodsystem existiert, das durch Stimuli von außen aktiviert werden kann und dessen Ablauf zum Tod der Zelle unter Auftreten charakteristischer morphologischer Veränderungen führt. Er und seine Ko-Autoren bezeichneten diesen Vorgang als „Apoptose“, altgriechisch für „Wegfallen“, etwa Abfallen von Blättern von Bäumen und Blütenblättern von Blumen, um das Prinzip zu beschreiben, dass sich der vielzellige Organismus durch Apoptose von Teilen seiner selbst entledigt als eines für den Organismus vorteilhaften Vorgangs. Die Autoren waren der Meinung, dass Apoptose eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellzahl sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen in einer Vielzahl von Geweben spielt. Aufgrund ihrer Untersuchungen zogen sie den Schluss, dass die Apoptose ein grundlegendes biologisches Phänomen darstellt, das wie die Mitose eine wichtige Funktion in der Regulation tierischer Zellpopulationen besitzt, anders als die Mitose jedoch als ein Mechanismus der kontrollierten Zellbeseitigung aufzufassen ist (Kerr et al., *Br J Cancer* 1972).

Bei den Untersuchungen von Kerr et al. handelte es sich um Studien zur Morphologie der Apoptose in Zellen des Menschen und der Ratte. Noch vor mehr als 20 Jahren war relativ wenig über die molekularen Mechanismen, die den charakteristischen morphologischen Merkmalen der Apoptose zugrunde liegen, bekannt (eine Diskussion über molekulare und genetische Aspekte der Apoptose aus dem Jahre 1980 findet sich in Wyllie et al., *Int Rev Cytol* 1980). Heute weiß man, dass die morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen die Folge der Aktivierung eines intrazellulären Signaltransduktionsweges ist, dessen einzige Funktion es wahrscheinlich ist,

auf entsprechende Reize die Zelle zu töten und für die geregelte Beseitigung der toten Zelle zu sorgen.

Sehr intensive Arbeiten in den Jahren seit etwa 1980 beschrieben zunächst, in welchen Situationen und Zellen Apoptose ausgelöst wurde und charakterisierten die morphologischen Veränderungen, die die Apoptose kennzeichnen. Die ersten Gene, die sog. *ced*-Gene (*ced* steht für “cell death defective”), die an der Regulation des physiologischen Zelltods beteiligt sind, wurden 1986 in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Ellis and Horvitz, *Cell* 1986).

In den letzten Jahren hat die Erforschung dieses „physiologischen“, da für den Organismus wünschenswerten Zelltods, große Fortschritte gemacht. Zur Zeit hat man einen relativ guten - wenn auch unvollständigen - Überblick über die Vielzahl von Genen, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Es wird mit Hochdruck daran gearbeitet, die komplexen interaktiven Signalwege der Apoptose aufzuklären, um spezifische Strategien für die Bekämpfung von Krankheiten (die auf eine Deregulation des Apoptosesystems beruhen) zu entwickeln (Afford and Randhawa, *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000).

1. 2. 3 Merkmale der Apoptose

Zellen, die durch Apoptose sterben, zeigen in den meisten Situationen ein sehr ähnliches Muster an morphologischen Veränderungen. Diese Uniformität der Morphologie apoptotischer Zellen hat viel zu der Erkenntnis beigetragen, dass die Apoptose in wahrscheinlich allen physiologischen Situationen von demselben Signaltransduktionsweg verursacht wird.

Lichtmikroskopisch können bei apoptotischen Zellen folgende morphologische Veränderungen beobachtet werden: zunächst kommt es zu einem Abrunden und Herauslösen der Zelle aus dem Zellverband und der extrazellulären Matrix. Ausstülpungen der Plasmamembran (sog. „Blebs“) sowie Kondensation des Zellkerns sind zu erkennen. In einer späteren Phase kondensiert die gesamte Zelle und es kommt zur Fragmentierung der Zelle in sog. apoptotische Körper (“apoptotic bodies“). Diese apoptotischen Körper sind membranumschlossene Vesikel unterschiedlicher Größe, die alle Bestandteile der Zelle wie zytosolische Bestandteile, Organellen oder Teile des kondensierten Nukleus' in unterschiedlichen Kombinationen enthalten (Häcker, *Cell Tissue Res* 2000; Kerr et al., *Br J Cancer* 1972). Die apoptotischen Körper werden in einem nächsten Schritt von anderen Gewebs- oder Epithelzellen oder von Makrophagen phagozytiert (Kerr et al., *Br J Cancer* 1972; Wyllie et al, *Int Rev Cytol* 1980).

Ein in der Praxis zum Nachweis der Apoptose häufig ausgenutztes Merkmal ist die Fragmentierung der genomischen DNA; nach Auftrennung der genomischen DNA auf einem Agarosegel ergeben diese Fragmente ein charakteristisches leiterartiges Muster, das als „DNA-Ladder“ bezeichnet wird. Die genomischen DNA-Fragmente entstehen durch die Aktivität einer Endonuklease (Wyllie, *Nature* 1980). Diese Endonuklease, inzwischen als DFF bzw. CAD (DNA-Fragmenting Factor bzw. Caspase-Activated DNase) bekannt, wird während der Apoptose durch die proteolytische Aktivität von Caspase-3 und vermutlich weiteren Caspasen freigesetzt und aktiviert (Liu et al., *Cell* 1997; Enari et al., *Nature* 1998).

1. 2. 4 Molekulare Mechanismen der Apoptose

Die zentralen Effektormoleküle der Apoptose stellen die Caspasen dar. Es sind evolutionär hochkonservierte Cysteinproteasen, die in vielen Organismen vorkommen (im Menschen und in der Maus, in Insekten und Nematoden sowie im Nesseltier *Hydra*). Alle bekannten Caspasen besitzen ein Cystein im aktiven Zentrum und spalten ihre Substrate nach einem Aspartatrest in der Polypeptidkette (der Name „Caspase“ leitet sich von diesen Eigentümlichkeiten her: C(ysteine)-Asp(-ase). In den meisten Fällen ist das Pentapeptid QACRG (Gln-Ala-Cys-Arg-Gly) im aktiven Zentrum anzutreffen.

Caspasen werden als Proenzyme (30-50kDa) exprimiert und bestehen aus drei Domänen: eine N-terminale Domäne (Prodomäne), eine große (~20kDa, p20) und eine kleine (~10kDa, p10) Untereinheit. Die Aktivierung von Caspasen nach einem apoptotischen Stimulus erfolgt nach proteolytischer Spaltung nach Aspartatresten an mehreren Stellen in der Peptidkette, so dass ein Molekül der Größe von ~20kDa (p20) und ein Molekül von ~10kDa (p10) entstehen. Jeweils zwei dieser Moleküle assoziieren zu einem Heterotetramer mit zwei aktiven Zentren. Caspasen sind weiterhin in der Lage, sich gegenseitig zu aktivieren. Es wird angenommen, dass Caspasenaktivierung während des Zelltods einen kaskadenähnlichen Verlauf hat, wobei ursprünglich wenige aktive Moleküle einer Caspase zur Aktivierung einer großen Menge von Caspasen in einer Zelle führt.

Beim Menschen sind gegenwärtig mindestens 10 Caspasen bekannt (die tatsächliche Anzahl ist wegen kleiner Sequenzabweichungen in den veröffentlichten Genen unsicher; Übersicht in Gastman, *Head & Neck* 2001). Nicht von allen Caspasen ist die exakte Funktion bekannt. Caspase-1 und -11 spalten Vorläufermoleküle, aus denen reife Zytokine hervorgehen, Caspase-8, -9 und -10 initiieren die Fortpflanzung apoptotischer Signale (sog. Initiatorcaspasen) und Caspase-3, -6, und -7 fungieren als „Effektoren“ (Effektorcaspasen), indem sie eine Reihe von

spezifischen Substraten spalten. Es ist die durch diese proteolytische Spaltung verursachte Veränderung der Funktion solcher Substrate, die zu den typischen Merkmalen der Apoptose (s. o.) führt.

Es gibt zwei bekannte Wege, auf denen Caspasen aktiviert werden können. Beim extern durch sogenannte Todesrezeptoren induzierten Mechanismus binden externe Liganden an Rezeptoren aus der Familie der Tumor Nekrose Rezeptoren/ Todesrezeptoren (z. B. CD95L an CD95), was zur Trimerisierung des Rezeptors und anschließend zur Rekrutierung von Adaptormolekülen (z. B. FADD) und Aktivierung der „Initiatorcaspase“ (s.u.) Caspase-8 (und wahrscheinlich Caspase-10) führt. Caspase-8 aktiviert weitere nachgeschaltete Caspasen (z. B. Caspase-3), welche im weiteren Verlauf durch die Spaltung zellulärer Substrate die morphologischen Ereignisse der Apoptose auslösen.

Im anderen Fall, dem „mitochondrialen“ Signalweg, führt ein Signal (z. B. DNA-Beschädigung, zellulärer Stress) zur Freisetzung von Cytochrom c (sowie weiterer mitochondrialer Proteine wie IAPs und Smac/DIABLO) aus den Mitochondrien. Cytochrom c bindet an Apaf-1 und führt unter Beteiligung von dATP/ATP zur Multimerisierung von Apaf-1. Dies hat eine Aktivierung von Caspase-9 (einer Initiatorcaspase) zur Folge. Die aktive Caspase-9 kann nun weitere Caspasen wie Caspase-3 aktivieren (siehe auch Abb. 2).

Weitere Regulatorproteine wie die mitochondrialen Proteine AIF und Smac/DIABLO und die zellulären Proteine Bax, cFLIP, und die IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) greifen an verschiedenen Stellen stimulierend oder hemmend in die Signalwege ein. Eine Querverbindung zwischen extern induziertem und innerem Signalweg wird durch das Molekül Bid hergestellt, das durch Caspase-8 gespalten und aktiviert wird.

(Adams and Cory, *Trends in Biochem Sci* 2001; Ashkenazi and Dixit, *Science* 1998;

Green, *Cell* 2000; Hengartner, *Nature* 2000; Los et al., *Trends in Immunology* 2001; Thornberry and Lazebnik, *Science* 1998)

1. 2. 5 Anwendungen der Apoptose

Beispiele von apoptotischen Vorgängen finden sich im gesamten Tier- und möglicherweise auch im Pflanzenreich. Apoptose ist ein lebenswichtiger Prozess während der normalen Entwicklung und während des adulten Lebens vieler Organismen. Beim Menschen kann die Deregulation der Apoptose zu inflammatorischen, malignen, autoimmunen und neurodegenerativen Erkrankungen führen (Afford and Randhawa, *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000).

1. 2. 5. 1 Apoptose während der Entwicklung, zur Aufrechterhaltung der Homöostase und als Verteidigung gegen toxische Substanzen.

Apoptose findet beispielsweise während der Embryogenese statt, wenn einige Zellen ihre Funktion erfüllt haben und nicht länger gebraucht werden oder wenn sie es nicht geschafft haben, sich durch adäquaten Kontakt in einen Gewebsverband einzugliedern (Clarke, *Anat Embryol* 1990; Rubin, *Br Med Bull* 1997); Sanders and Wride, *Int Rev Cytol* 1995).

Weitere Beispiele für physiologischen Zelltod während der Entwicklung sind etwa die Entstehung der Hände bei höheren Vertebraten einschließlich des Menschen (Abbau der „Schwimmhäute“) und das Abwerfen des Schwanzes der Kaulquappe, wenn sie sich zum Frosch entwickelt (Jacobson, *Cell* 1997).

Eine gut studierte Form der Apoptose greift in die Entwicklung des Immunsystems ein. Unerwünschte autoreaktive T-Zellen oder Thymozyten mit unvollständig umgeordneten T-Zell-Rezeptorgenen werden durch Auslösen der apoptotischen Signaltransduktion innerhalb dieser Zellen eliminiert (King and Ashwell, *Thymus* 1994).

Neben diesem, in der Entwicklung stattfindenden Zelltod, ist die Apoptose eine wichtige „Verteidigungsmöglichkeit“ gegenüber zellulären Schäden: Zellen mit DNA-Schäden stoppen entweder den Zellzyklus und aktivieren Reparaturmechanismen oder, wenn dies nicht möglich ist, aktivieren sie die apoptotische Signaltransduktion (Yonish-Rouach, *Experientia* 1996; Bellamy, *Br Med Bull* 1997).

In erwachsenen Organismen wird die Apoptose fernerhin eingesetzt, um die Anzahl von Zellen in einem proliferierenden Gewebe konstant zu halten und um Zellen abzutöten, die aufgrund von

molekularen Veränderungen ihre Funktion nicht mehr erfüllen können oder dem Organismus gefährlich werden könnten (Jacobson et al., *Cell* 1997). Die Funktion der Apoptose bei der Aufrechterhaltung der Homöostase ist wohl am deutlichsten bei Komponenten des Immunsystems beschrieben (Abbas, *Cell* 1996; Nagata, *Cell* 1997), gilt aber sehr wahrscheinlich für alle fortlaufend proliferierenden Gewebe (Häcker, *Med Welt* 1999). Beispielsweise werden Granulozyten laufend im Knochenmark neu hergestellt und in die peripheren Gefäße ausgeschwemmt, wo sie nach wenigen Tagen durch Apoptose sterben (Lagasse et al., *J Exp Med* 1994). Im Blutbildungs-System von Vertebraten ist der Umfang der Apoptose gewaltig, z. B. sterben täglich Milliarden von Neutrophilen auf diese Weise in einem erwachsenen Menschen (Alberts, *Molekularbiologie der Zelle*, 1995).

Eine weitere Anwendung des Apoptosesystems ist die Beseitigung infizierter oder genetisch veränderter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten: durch verschiedene membranständige und sezernierte Faktoren zwingt die zytotoxische Zelle ihre erkannte Zielzelle dazu, ihr Apoptosesystem zu aktivieren und Selbstmord zu begehen (Sarin et al., *Immunity* 1997; Shi et al., *J Exp Med* 1997).

1. 2. 5. 2 Apoptose bei viralen und bakteriellen Infektionen

Eine wichtige Funktion der Apoptose besteht in der Regulation der Immunantwort bei viralen und bakteriellen Infektionen. Hierbei spielt die Induktion von Apoptose auf verschiedenen Ebenen eine Rolle: zum einen kann sie die Infektion begrenzen, was für den Wirtsorganismus vorteilhaft ist, zum anderen können Bakterien und Viren die Apoptose in Wirtszellen sowohl induzieren als auch hemmen, um ihre eigene Vermehrung im Wirtsorganismus zu fördern (Müller and Rudel, *Int J Med Microbiol* 2001).

Einige Bakterienspezies können wichtige Zellen des Immunsystems durch Induktion von Apoptose schädigen. Beispielsweise induzieren die Bakterien der Gattung *Shigella*, *Salmonella* und *Yersinia* Apoptose in Makrophagen sowohl in vitro (Zychlinski et al., *Nature* 1992; Chen et al., *Mol Microbiol* 1996; Monack et al., *Proc Natl Acad Sci* 1997) als auch in vivo (Zychlinski et al., *Infect Immun* 1996; Monack et al., *J Exp Med* 2000; Monack et al., *J exp Med* 1998). Von den bakteriellen Pathogenen *Chlamydia* und *Rickettsia* ist bekannt, dass sie die Apoptose in infizierten Zellen zu inhibieren vermögen (Fan et al., *J Exp Med* 1998; Dean and Powers, *Infect Immun* 2001; Clifton et al., *Proc Natl Acad Sci* 1998). Diese Bakterienarten sind zum Überleben als obligat intrazelluläre Pathogene auf ihre Wirtszellen angewiesen; es ist für sie vorteilhaft, bis

zur Vollendung ihres Lebenszyklusses das Leben der Wirtszellen aufrechtzuerhalten bzw. zu verlängern (Müller and Rudel, *Int J Med Microbiol* 2001).

Im Laufe der letzten Jahre sind eine Reihe von Viren identifiziert worden, die Gene tragen, die für antiapoptotische Proteine kodieren (Übersicht in Alcamí and Koszinowski, *Mol Med Today* 2000). Solche viralen Apoptoseinhibitoren sind z. B. die IAPs aus der Familie der Baculoviren und das P35-Protein (s. u.) aus dem Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus [AcNPV] (Übersicht in Miller, *J Cell Physiol* 1997), das Adenovirus E1B 19K-Protein (siehe Thomson, *Int J Exp Pathol* 2001), das Cowpox Virus-Protein CrmA (Cytokine Response Modifier A, diskutiert in Smith et al., *EMBO* 1996) oder Proteine aus der Familie v-FLIP (Viral FLICE Inhibitory Proteins, Diskussion in Thomson, *Int J Exp Pathol* 2001).

Einige Viren (bzw. deren Genprodukte) können Apoptose in Zellen induzieren, wie z. B. das Influenza A & B-Virus (Hinshaw et al., *J Virol* 1994), die Adenovirus E1A-Proteine (Rao et al., *Proc Natl Acad Sci* 1992), das Protein R (Vpr) aus dem HIV-1-Virus (Yao et al., *J Virol* 1998; Stewart et al., *J Virol* 1997) und das Hepatitis B Virus HBx-Protein (Kim et al., *J Biol Chem* 1998; Terradillos et al., *Oncogene* 1997). Für das Hbx-Protein wurde allerdings auch eine antiapoptotische Eigenschaft festgestellt (Elmore et al., *Proc Natl Acad Sci* 1997; Gottlob et al., *J Biol Chem* 1998).

Da Viren Wirtszellen zu ihrer eigenen Vermehrung benötigen, bedeutet der Tod einer infizierten Zelle das Ende der viralen Infektion. Durch aktivierte katabole Enzyme während der Apoptose werden wahrscheinlich auch Virusmoleküle abgebaut. Es ist also wahrscheinlich, dass der beobachtete Zelltod nach Virusinfektion eine zelluläre Reaktion ist, die für den Wirtsorganismus günstige Effekte hat (Vaux et al., *Cell* 1994). Am deutlichsten wird diese Interpretation durch die Beobachtung gestützt, dass viele Viren Gene mit sich tragen, die den Tod infizierter Zellen verhindern oder verlangsamen (Übersicht in Alcamí and Koszinowski, *Mol Med Today* 2000 und Vaux and Strasser, *Proc Natl Acad Sci* 1996).

Andererseits kann die Apoptoseinduktion nach Virusinfektion auch vorteilhaft für das Virus sein: da Apoptose zu einer schnellen Beseitigung der defragmentierten Zellen (der apoptotischen Körper) führt, kommt es nicht in dem Ausmaße zur Stimulierung des Immunsystems, wie es bei lysierten Zellen, die ihre intrazellulären Bestandteile in das umgebende Gewebe abgeben, der Fall wäre. Ferner gibt es Hinweise darauf, dass Viren nach Auslösen der Apoptose die Zellfragmente als Vehikel zur weiteren Übertragung nutzen und dadurch das Immunsystem umgehen können (Thomson, *Int J Exp Pathol* 2001). Somit stellt die Regulation der Apoptose durch Viren

eine Balance dar zwischen der Minimierung der Immunantwort durch Induktion der Apoptose einerseits und der Optimierung der Virusproduktion durch Inhibition der Apoptose andererseits (Collins, *Am J Respir Crit Care Med* 1995;).

1. 2. 6 Apoptoseinhibition durch Baculoviren

Baculoviren (Familie *Baculoviridae* [Matthews, 1982]) sind zu den Kernpolyhedrosis-Viren gehörende, insektenpathogene und insektenspezifische Viren, deren prominenteste Vertreter *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) und *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV) sind. Beide Viren befallen mehr als 30 verschiedene Insektenspezies aus der Familie der *Lepidoptera*.

Das etwa 129 kBp-große Genom dieser Viren besteht aus ringförmig geschlossene, doppelsträngige DNA und wird im Kern der infizierten Zelle repliziert. Die Replikation der viralen DNA beginnt etwa 6 Stunden nach der Infektion. Im Verlauf der Infektion entstehen sowohl freie extrazelluläre Viruspartikel, die neue Zellen infizieren können als auch sog.

Einschlusskörper, die aus Polyhedrin, einem viruskodierten Protein bestehen. In den Einschlusskörpern sind Viruspartikel eingebettet. Diese werden nach etwa 4-5 Tagen durch Lyse der Zelle freigesetzt und können von Insekten aufgenommen werden, wodurch ein neuer Infektionszyklus beginnt (Ibelgaufs, 1993).

Das P35-Protein aus dem Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (Ac-P35-Protein) ist ein Inhibitor der Apoptose in verschiedenen Organismen. Diese Inhibition ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Blockierung von Caspasen zurückzuführen (siehe Problemstellung und Abschnitt 1. 2. 6. 1).

Das Protein P35 aus *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (Bm-P35-Protein) besitzt zwar eine etwa 90%ige Homologie zu Ac-P35, ist jedoch im Vergleich zu Ac-P35 nur sehr eingeschränkt in der Lage, die Apoptose zu inhibieren (Morishima et al., *FEBS* 1998 und siehe Vier et al., *Biochem Biophys Res Comm* 2000).

Die Proteine Cp-IAP und Op-IAP aus *Cydia pomonella* Granulosis Virus (CpGV) und *Orgyia pseudotsugata* Nuclear Polyhedrosis Virus (OpNPV) sind baculovirale IAP-Proteine, die Apoptose inhibieren können. Das charakteristische Merkmal der (viralen und zellulären) IAP-Proteine ist ein Zink-bindendes BIR (Baculovirus IAP Repeat)-Motiv (welches auch mehrfach vorkommen kann). Viele IAPs enthalten außerdem ein weiteres Zink-bindendes Motiv, das sog.

RING-Finger-Motiv, welches u. a. für eine optimale Antiapoptose-Funktion notwendig ist (Clem, *Cell Death Differ* 2001; Miller, *J Cell Phys* 1997). Der Mechanismus der Apoptoseinhibition durch virale und zelluläre IAP-Proteine wird zur Zeit noch untersucht, es ist jedoch wahrscheinlich, dass dabei die Inhibition von Caspasen eine Rolle spielt (Diskussion in Clem, *Cell Death Differ* 2001).

1. 2. 6. 1 Apoptoseinhibition durch virales P35-Protein

Ein Modell der Caspaseninhibition sieht vor, dass Ac-P35 als Substrat von Caspasen gespalten wird und die Bruchstücke einen stabilen Komplex mit der Protease eingehen (Bump et al., *Science* 1995; Bertin et al., *J Virol* 1996; Zhou et al., *Biochemistry* 1998). Die Spaltung erfolgt hierbei nach einem Aspartatrest in der Sequenz 84-DQMD↓G-88 (Asp-Gln-Met-Asp↓Gly) des Ac-P35-Proteins (Fisher et al., *EMBO* 1999; Bertin et al., *J Virol* 1996). Bump et al konnten zeigen, dass Ac-P35 von Caspase-1 gespalten wird und dass die 10 und 25 kDa-großen Fragmente (p10 und p25) von Ac-P35 einen stabilen Komplex mit der inhibierten Caspase bildeten (Bump et al., *Science* 1995). Die Autoren gehen davon aus, das Ac-P35 als irreversibler Caspaseninhibitor wirkt, während Xue und Horvitz zusätzlich postulierten, dass Ac-P35 ein kompetitiver Caspaseninhibitor ist, wenn es in hohen Konzentrationen in der Zelle vorliegt (Xue and Horvitz, *Nature* 1995).

Neuere Untersuchungen geben Aufschluss über den molekularen Mechanismus der Caspaseninhibition durch Ac-P35: die Kristallstruktur eines Ac-P35-Caspase-8-Komplexes wurde untersucht und es konnte festgestellt werden, dass die Inhibierung der Caspase durch die Bildung einer Thioesterbindung (zwischen Asp-87 von Ac-P35 und dem nucleophilen Cys-360 der Caspase) erfolgte, dessen hydrolytische Spaltung durch die Positionierung des N-Terminus' von Ac-P35 in das aktive Zentrum der Caspase verhindert wurde. Diese Positionierung des N-Terminus' wird nach Ansicht der Autoren durch eine Serie von Konformationsänderungen ermöglicht, die das Ac-P35-Protein nach proteolytischer Spaltung durch die Caspase erfährt (Xu et al., *Nature* 2001). Dieses Modell der Caspaseninhibition, wonach spezifische Konformationsänderungen des Ac-P35-Proteins nach proteolytischer Spaltung zur Inhibition der Caspase führen, wird im Übrigen durch Arbeiten von Fisher et al und Dela Cruz et al unterstützt (Fisher et al., *EMBO* 1999 und Dela Cruz et al., *J Biol Chem* 2001).

Die dreidimensionale Struktur des monomeren Ac-P35-Proteins, wie sie nach Kristallstrukturanalyse an gereinigtem Ac-P35-Protein gewonnen wurde (Fisher et al., *EMBO* 1999) zeigt, dass der zentrale Bereich des Proteins aus mehreren antiparallel angeordneten β -Faltblatt-Strukturen besteht, die von einer darüberliegenden α -Helix (α 1-Helix) überquert wird. Diese Helix geht über in einen Ring, der die Caspasenerkennungssequenz Asp-Gln-Met-Asp (s. o.) enthält. Helix und Ring bilden eine große Schlaufe (Aminosäuren 60-98), die auch als Reactive Site Loop (RSL) bezeichnet wird. An der Spitze der RSL befindet sich die Caspasenschnittstelle Asp87-Gly88, die für Caspasen frei zugänglich ist. Untersuchungen ergaben, dass Interaktionen zwischen Resten der α 1-Helix und solchen der β -Faltblatt-Strukturen für die Caspaseninhibition und die Bildung von Homodimeren notwendig sind. Die Autoren zogen aus ihren Beobachtungen den Schluss, dass die RSL infolge intramolekularer Interaktionen (zwischen α 1 und den β -Faltblatt-Strukturen) eine spezifische räumliche Orientierung annimmt, und dass dies für die Inhibierung von Caspasen notwendig ist. Weiterhin konnten sie demonstrieren, dass die Homodimerisierung von Ac-P35 durch die Interaktion zwischen der RSL des einen Monomers und den β -Faltblatt-Strukturen des anderen Moleküls erfolgt (Zoog et al., *J Biol Chem* 1999).

1. 2. 7 Das Caspasenadaptormolekül Apaf-1

Apaf-1 ist ein 130-kDa großes Protein, das aus einer NH₂-terminalen CARD- (= *Caspase Recruiting Domain*), einer CED-4-homologen Domäne sowie einer COOH-terminalen WD-40-Repeat-Region besteht. Es ist in menschlichen Zellen vorhanden und zu CED-4 aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* homolog (Zou et al., *Cell* 1997). CED-4 ist ein Adaptorprotein, welches ein apoptotisches Signal empfangen kann und an CED-3 binden und diese aktivieren kann (Vaux, *Cell* 1997; Green, *Nature* 2001). CED-3 aus *C. elegans* ist homolog zur Caspase-1 des Menschen (Yuan et al, *Cell* 1993 und siehe Gastman, *Head & Neck* 2001).

Die CARD-Domäne von Apaf-1 dient der Interaktion mit Procaspase-9 (s. u.), die CED-4-homologe Domäne enthält Nukleotidbindungsstellen (Walker A and B Boxes, Zou et al., *J Biol Chem* 1999) und ist für die Homodimerisierung von Apaf-1-Molekülen notwendig (Adrain et al., *J Biol Chem* 1999). Die C-terminalen WD-40 (WD = Trp-Asp)-Sequenzen² sind höchstwahrscheinlich für die Bindung von Cytochrom c notwendig (Purring-Koch and McLendon, *PNAS* 2000; Benedict et al., *J Biol Chem* 2000 und s. u.).



Abb. 1: Struktur von Apaf-1 (nach Zou et al., *J Biol Chem* 1999).

Gezeigt ist die schematische Struktur von Apaf-1, die die verschiedenen Domänen veranschaulicht. Die Aminosäuresequenz der N-terminalen CARD-Domäne ist zur N-terminalen Prodomäne der Caspase aus *C. elegans*, CED-3, homolog (Aminosäuren: 21% identisch, 53% konserviert), während die anschließende CED-4-Domäne homolog zum *C. elegans*-Protein CED-4 ist (Aminosäuren: 22% identisch, 48% konserviert). In der C-terminalen Hälfte von Apaf-1 befinden sich 12 konservierte Sequenzen, die WD-40-Repeats (Zou et al, *Cell* 1997).

² WD-Proteine sind aus hochkonservierten, sich wiederholenden Sequenzen zusammengesetzt, die typischerweise mit der Sequenz Trp-Asp (WD) enden. Sie kommen in Eukaryoten vor und regulieren wichtige zelluläre Funktionen wie z. B. die Zellteilung und die Transkription (Neer et al., *Nature* 1994).

Eine Reihe von Studien hat die molekulare Funktion von Apaf-1 aufgeklärt: Studien haben gezeigt, dass Apaf-1 in Anwesenheit von dATP und Cytochrome c an Procaspase-9 binden konnte und dass eine Oligomerisierung von Apaf-1 zur Aktivierung der Procaspase-9 führte (Li et al., *Cell* 1997; Srinivasula et al., *Mol Cell* 1998; Adrain et al., *J Biol Chem* 1999; Saleh et al., *J Biol Chem* 1999; Zou et al., *J Biol Chem* 1999). Außerdem konnte in Experimenten gezeigt werden, dass rekombinante aktive Caspase-9 Procaspase-3 und -7 aktivieren konnte (Li et al., *Cell* 1997; Srinivasula et al., *Mol Cell* 1998).

Im Laufe der letzten Jahre ist ein Modell der Caspasenaktivierung erwachsen, wonach aus den Mitochondrien freigesetztes Cytochrom c zunächst an Apaf-1 bindet und eine Konformationsänderung von Apaf-1 herbeiführt (was die CARD-Domäne exponiert, die dann an das korrespondierende Motiv der Procaspase-9 bindet [Li et al., *Cell* 1997]). Dies führt zur Oligomerisierung von Apaf-1-Molekülen und zur Bildung eines etwa 1,3 MDa-großen Proteinkomplexes („Apoptosom“), welches Procaspase-9 rekrutiert und aktiviert (Zou et al., *J Biol Chem* 1999). Die Oligomerisierung von Apaf-1 und die Bildung des Apoptosoms erfordert im Weiteren die hydrolytische Spaltung von dATP/ATP (bzw. Bindung von dATP an Apaf-1 [Jiang and Wang, *J Biol Chem* 2000]) durch Apaf-1 (Zou et al., *J Biol Chem* 1999).

Zusätzlich zu dem beschriebenen ~1,3 MDa-Apoptosom wurde auch ein ~700 kDa-großes Apaf-1-Apoptosom aus dATP-aktivierten Zelllysaten und aus apoptotischen Zellen isoliert. Letzteres enthielt aktivierte Caspase-9, -3 und -7 (Cain et al., *J Biol Chem* 1999). Die Autoren zeigten weiterhin, dass das ~700 kDa-große Apoptosom, im Gegensatz zum ~1,3 MDa-Apoptosom, in apoptotischen Zellen überwog und dass nur dieses in der Lage war, Effektorcaspasen zu aktivieren. Nach Ansicht der Autoren ist es dieses ~700 kDa-Apoptosom, das die biologisch aktive Form des Apoptosoms darstellt (Cain et al., *J Biol Chem* 2000). Die Core-Einheit eines 700 kDa-Apoptosoms besteht vermutlich aus einem Apaf-1-Tri- oder Tetramer (Adrain and Martin, *Trends Biochem Sci* 2001) und ist in Abb. 2 als wesentliche Komponente des Apaf-1-abhängigen Apoptose-Signaltransduktionsweg schematisch dargestellt.

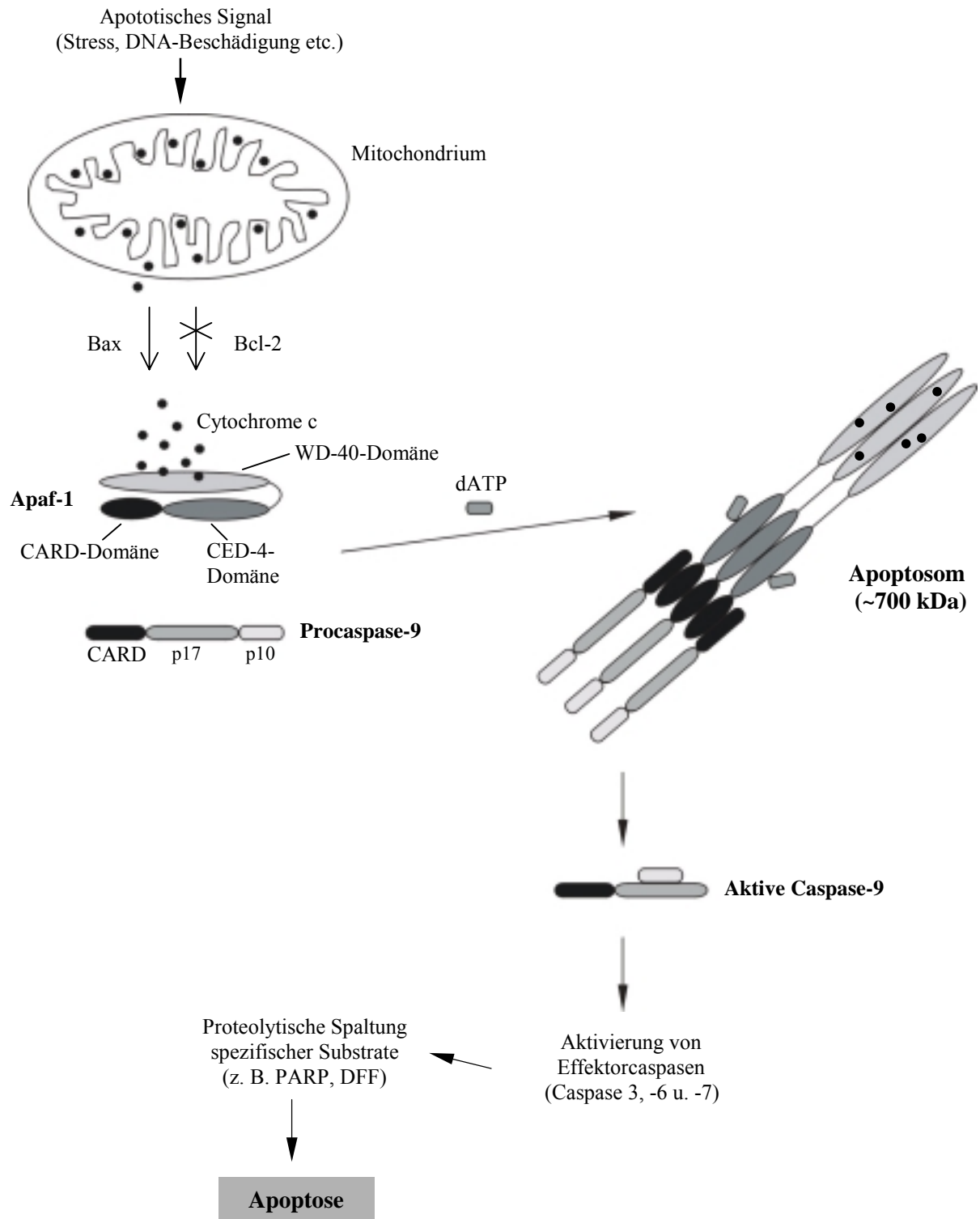


Abb. 2: Apaf-1-abhängiger Apoptose-Signaltransduktionsweg (nach Adrain and Martin, *Trends Biochem Sci* 2001 und Purring-Koch and McLendon, *PNAS* 2000).

Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien führt unter Beteiligung von dATP zur Bildung des Apaf-1-Apoptosoms, in dem Procaspase-9 autokatalytisch aktiviert wird. Der Austritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien als Folge eines apoptotischen Stimulus wird von Proteinen der Bcl-2-Familie reguliert; Bax erleichtert, Bcl-2 bremst diesen Vorgang (Übersicht in Green, *Cell* 2000 und Adams and Cory, *Trends Biochem Sci* 2001).

1. 3 Problemstellung

1. 3. 1 Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Baculovirusproteins Ac-P35

Im Jahre 1991 wurde erstmals von Miller und Mitarbeitern gezeigt, dass das viral codierte Protein P35 aus dem Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (Ac-P35-Protein) die Apoptose während der Infektion von Insektenzellen inhibiert (Clem et al., *Science* 1991). Im Laufe der folgenden Jahre konnte gezeigt werden, dass Ac-P35 die Apoptose in verschiedenen Organismen wie z. B. in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Sugimoto et al., *EMBO* 1994), der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Hay et al., *Development* 1994) und dem Menschen (Beidler et al., *J. Biol. Chem.* 1995; Datta et al., *J. Biol. Chem.* 1997; Qi et al., *Oncogene* 1997) inhibiert. Diese Inhibition ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Blockierung von Caspasen zurückzuführen: in vitro-Versuche an gereinigten Caspasen zeigten, dass Ac-P35 diese Proteasen zu inhibieren vermochte (Ahmad et al., *J. Biol. Chem.* 1997; Bump et al., *Science* 1995; Zhou et al., *Biochemistry* 1998; Xue and Horvitz, *Nature* 1995).

Caspasen sind evolutionär hochkonservierte Proteasen, die in vielen Organismen vorkommen und eine zentrale Rolle bei der Apoptose spielen (Hengartner, *Nature* 2000). Ac-P35 agiert durch die Inhibition von Caspasen an einer sehr zentralen Stelle des Apoptosewegs, der zwischen evolutionär weit voneinander entfernten Systemen konserviert ist. Zusammen mit der Tatsache, dass die etwa 150 Gene der Baculoviren im Laufe der Evolution aus (infizierten) Wirtszellen übernommen worden sind (Miller, *J Cell Phys* 1997) - möglicherweise mit Mutationen, die dem Virus einen Selektionsvorteil gewähren - deutet dies daraufhin, dass ein zelluläres P35-Homolog existiert, das möglicherweise eine Funktion an einer wichtigen Schaltstelle des Apoptosepfades besitzt und dessen Funktion von Ac-P35 entweder imitiert oder aufgehoben wird. Eine Reihe von Beispielen für solche „Übernahmen“ sind bekannt. So sind etwa bei den Apoptose regulierenden Proteinen virale Homologe des zellulären Apoptoseinhibitors Bcl-2 bekannt, die ebenso Apoptose inhibieren können (Übersicht in Thomson, *Int J Exp Pathol* 2001), als auch virale und zelluläre IAPs (Übersicht in Clem, *Cell Death Differ* 2001; Müller and Rudel, *Int J Med Microbiol* 2001; Miller, *J Cell Physiol* 1997) oder virale und zelluläre FLIPs (FLICE Inhibitory Proteins, Übersicht in Müller and Rudel, *Int J Med Microbiol* 2001; Thomson, *Int J Exp Pathol* 2001).

In (unveröffentlichten) Arbeiten, die von Prof. Dr. G. Häcker und Mitarbeitern am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität München durchgeführt worden sind, wurden deutliche Hinweise auf die Existenz eines zellulären Homologs von Ac-P35 gefunden: ein polyklonales Antiserum, das gegen Ac-P35 gerichtet war, erkannte in Zelllysaten von Vertebratenzellen ein etwa 37 kDa großes Protein, das aufgrund seiner Größe und der spezifischen Reaktion mit dem Antikörper (und weiteren Eigenschaften, s. u.) als ein zelluläres Homolog von Ac-P35 gedeutet wurde (Abb. 1).

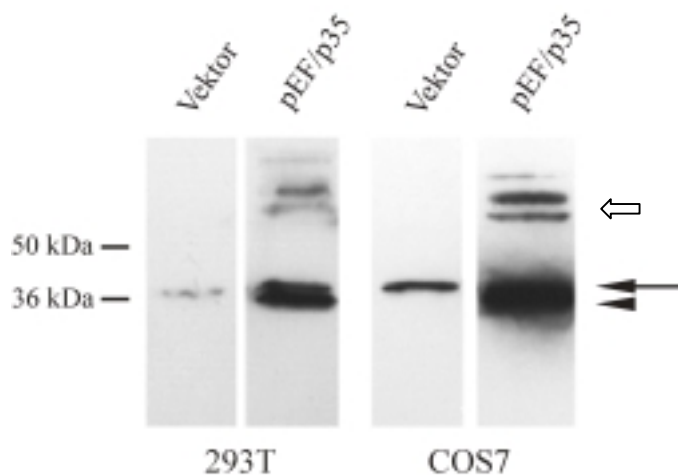


Abb. 3: Ein Antiserum gegen virales P35 erkennt virales P35 in Vertebratenzellen sowie ein zelluläres Protein, c-P35.

Zellen der Zelllinien 293T (transformierte menschliche Fibroblasten) und COS7 (transformierte Affenfibroblasten) wurden entweder mit einem leeren pEF-Expressionsvektor (Kontrolle, 1. und 3. Spur) oder dem Ac-P35-Expressionskonstrukt pEF/p35 (2. und 4. Spur) transfiziert. Lysate dieser Zellen wurden nach 48 h im Western Blot mittels eines polyklonalen Antiserums gegen das virale P35-Protein auf die Expression von Ac-P35 untersucht. Sichtbar ist eine Bande von etwa 35 kDa in den pEF/p35-transfizierten Zellen (Ac-P35, Pfeilspitze), eine konsistente Bande bei etwa 37 kDa in allen Zellen (zelluläres P35, Pfeil) sowie mehrere größere Spezies bei etwa 70 kDa (Blockpfeil).

Mikroskopische Untersuchungen sowie Fraktionierungsstudien an Vertebratenzellen zeigten, dass das vermutete zelluläre P35 mitochondrial lokalisiert war. Deletionsmutanten von Ac-P35, die entweder nur die N-terminale oder die C-terminale Hälfte des Moleküls umfassten (N-P35 oder C-P35) konnten bei diesen Untersuchungen in den Mitochondrien (N-P35) sowie im Zytosol (C-P35) nachgewiesen werden (unveröffentlicht).

Weitere Experimente mit N-P35 in Vertebratenzellen deuteten daraufhin, dass N-P35 mit einem zellulären Protein interagieren konnte und mit diesem höhermolekulare Komplexe (70 kDa) bil-

dete (nicht gezeigt). Möglicherweise war in diesen Komplexen auch das vermutete zelluläre P35-Homolog enthalten.

In weiteren Versuchen an Vertebratenzellen wurde beobachtet, dass das postulierte zelluläre P35-Protein während der Apoptose zum einen aus den Mitochondrien ins Zytosol hinaustrat, zum anderen höhermolekulare Komplexe (70 kDa) entweder mit sich selbst oder einem anderen zellulären Protein einzugehen vermochte (nicht gezeigt).

In den Zelllysaten von Ac-P35-transfizierten Zellen, die das virale Protein stark exprimierten, traten außerdem höhermolekulare Spezies mit einer Molekülmasse von ca. 70 kDa auf (siehe Abb. 3). Diese Banden stellen möglicherweise Komplexe dar, die als Folge einer Homodimerisierung von Ac-P35 entstanden sind (im Verlaufe der Forschungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden sind, konnte im Interaction Trap-System die Homodimerisierung des viralen P35-Proteins nachgewiesen werden [Abschnitt 2. 1. 2]). Denkbar wäre jedoch auch, dass Ac-P35 mit dem postulierten zellulären Homolog oder eines weiteren zellulären Proteins interagiert und Heterodimere bildete.

Die Beobachtungen, die in diesen und weiteren Experimenten gemacht wurden, deuteten auf die Existenz eines ca 37 kDa-großen zellulären Proteins hin, das also mit dem viralen P35-Protein (bzw. seiner N-terminalen Hälfte) einige interessante Eigenschaften teilte: 1) es war in der Lage, höhermolekulare Komplexe mit sich selbst oder anderen zellulären Molekülen auszubilden, 2) es konnte anhand mikroskopischer Untersuchungen in den Mitochondrien lokalisiert werden. Die obigen Befunde legten zudem den Schluss nahe, dass es mit Ac-P35 direkt interagieren konnte (Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob eine solche Interaktion auch während der Apoptose stattfinden könnte bzw. welche Rolle sie während der Apoptose spielen würde). 3) Während der Apoptose gingen bestimmte Veränderungen vor sich wie der Austritt aus den Mitochondrien und Komplexbildung mit sich selbst und/oder zellulären Proteinen.

Aufgrund dieser Befunde wurde die Hypothese formuliert, dass das in Abb. 3 gezeigte, ca. 37 kDa-große Protein ein Kandidat für das postulierte zelluläre Homolog von Ac-P35 ist, das die evolutionäre „Vorlage“ von Ac-P35 war und außerdem in Vertebratenzellen an der Apoptose beteiligt ist. Möglicherweise befindet es sich an einer wichtigen Schaltstelle des evolutionär konservierten Apoptosewegs. Ein denkbarer Wirkungsmechanismus von Ac-P35 könnte z. B. darin bestehen, mit seinem zellulären Homolog direkt oder über gemeinsame Interaktionspartner im Zytosol der Zelle Komplexe einzugehen, die die Funktion des zellulären P35-Proteins während der Apoptose inhibieren. Neben der Inhibierung von Caspasen durch Ac-P35 könnte

dies ein zusätzlicher oder alternativer Weg sein, apoptotische Vorgänge in der Zelle zu beeinflussen.

Um dieses postulierte Homolog von Ac-P35 zu isolieren, und es anschließend hinsichtlich seiner Eigenschaften und Funktionen zu charakterisieren, wurde das Interaction Trap-System (siehe Abschnitt 4. 2. 2. 1) gewählt. Dieses System beruht auf der Interaktion zwischen zwei Proteinen, wobei eines der Proteine als „Köder“ fungiert, das andere als „Beute“. Das Interaction Trap-System ist derart konzipiert, dass die Interaktion zwischen „Köder“ und „Beute“ zur Aktivierung von zwei verschiedenen Reportergenen führt und dadurch das Erkennen und die Isolierung der „Beute“ erlaubt (s. u.). Als „Köderprotein“ wurde Ac-P35 eingesetzt. Um „Beute“ zu finden wurde in einer Population von Proteinen gesucht, die von cDNA-Genbibliotheken codiert wurden. Das Ziel war es nun, aufgrund der vermuteten spezifischen Interaktion zwischen Ac-P35 und seinem zellulären Homolog letzteres aus solchen Genbibliotheken „herauszuangeln“ um es zu isolieren und für weitere Untersuchungen zu klonieren.

Durch die Wahl des Interaction Trap-Systems war zudem die Möglichkeit gegeben, weitere spezifische Interaktionspartner von Ac-P35 zu identifizieren. Da viele virale Proteine mit mehreren zellulären Proteinen interagieren können, wäre das Aufspüren von weiteren Bindungspartnern von Ac-P35 mit dem Interaction Trap-System möglich. Neben den Caspasen und dem postulierten zellulären P35-Protein könnten demnach noch weitere Proteine existieren, die mit Ac-P35 interagieren und deren Identifizierung und Charakterisierung wichtige Beiträge bei der Aufklärung grundlegender zellulärer Prozesse darstellen würden.

1. 3. 2 Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Caspasenadaptormoleküls Apaf-1

Das 130 kDa-große Protein Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*) wurde erstmals im Jahre 1997 aus zytosolischen Fraktionen von HeLa-Zellen angereinigt und kloniert (Zou et al. *Cell* 1997). Apaf-1 spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation der Apoptose und ist vermutlich für die normale Entwicklung des ZNS während der Embryogenese verantwortlich. Dies wurde anhand von Untersuchungen an Apaf-1-defizienten Mäusen gezeigt: die Apaf-1-Mutanten wiesen schwerwiegende morphologische Anomalien des Kopfes auf, begleitet von einer Verringerung der Apoptose im Gehirn und einer Hyperproliferation neuronaler Zellen (Yoshida et al., *Cell* 1998 [s. u.] und siehe Benedict et al., *J Biol Chem* 2000).

Apaf-1 ist eine wichtige Komponente des mitochondrialen Apoptosesignalweges. Hierbei kommt es infolge eines apoptotischen Stimulus (z. B. zellulärer Stress) zu einem Ausströmen von Cytochrom c aus den Mitochondrien und zur Oligomerisierung von Apaf-1-Molekülen. Dies wiederum führt zur Aktivierung von Procaspase-9 und anschließend zur Aktivierung von Effektorcaspasen wie Caspase-3 und Caspase-7 (Green, *Cell* 2000 und siehe Jiang and Wang, *J Biol Chem* 2000 und Abb. 2).

Die Bindung von Apaf-1 an Caspase-9 erfolgt über die Interaktion der CARD (Caspase Recruitment Domain)-Domänen der beiden Proteine (Li et al., *Cell* 1997). Die WD-40-Domäne von Apaf-1 ist aller Wahrscheinlichkeit nach die Bindungsstelle für Cytochrome c (Purring-Koch and McLendon, *PNAS* 2000; Benedict et al., *J Biol Chem* 2000). WD-40-Domänen sind oft an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (siehe Neer et al., *Nature* 1994 und Sondeck et al., *Nature* 1997), in ähnlicher Weise stellt die CARD eine Domäne dar, die wesentlich am Aufbau von Proteinkomplexen beteiligt sein kann (Martin, *Trends Cell Biol* 2001). Es ist demnach denkbar, dass das Protein Apaf-1 mit Hilfe seiner CARD- und/oder WD-40-Domäne mit weiteren, nicht bekannten zellulären Proteinen interagieren kann (z. B. mit weiteren Caspasen) und somit an zusätzlichen, noch nicht geklärten Apoptosemechanismen (oder anderen zellulären Vorgängen) beteiligt sein könnte.

Einen konkreten Hinweis auf die mögliche Existenz von zusätzlichen Funktionen des Apaf-1-Proteins liefert ein Vergleich der Phänotypen von Apaf-1- und Caspase-9-Knockout-Mäusen: Untersuchungen an homozygoten Caspase-9- und Apaf-1-defizienten Mäusen (Hakem et al., *Cell* 1998; Yoshida et al., *Cell* 1998) zeigten, dass neben einer Verringerung der Apoptose im ZNS der Embryonen Zellen dieser Mutanten gegen diverse apoptotische Stimuli resistent waren. Der Anteil sowie die Überlebensrate dieser homozygoten Neugeborenen war in beiden Fällen

sehr gering. Beide Mutantentypen zeigten zudem ein übermäßiges Gehirnwachstum und eine abnormale Morphologie des Schädels.

Apaf-1^{-/-}-Mutanten wiesen in mehreren Bereichen des Kopfes Verformungen des Schädels auf, die auf einem übermäßigen Wachstum von Gehirngewebe in diesen Bereichen beruhten (“ectopic masses on the forehead”, “cauliflower-like mass on the face” und “cone-shaped mass on the head”, siehe Yoshida et al., *Cell* 1998). Caspase-9^{-/-}-Mutanten hingegen zeichneten sich durch das Hervortreten von Gehirngewebe nur im vorderen Schädelbereich auf (siehe Hakem et al., *Cell* 1998 und Yoshida et al., *Cell* 1998). Außerdem wurde eine Verzögerung im Abbau des interdigitalen Gewebes in den Apaf-1^{-/-}-Embryonen, jedoch nicht in den Caspase-9^{-/-}-Mutanten beobachtet (Zellen dieses Gewebes [“Interdigital Webs”, siehe Yoshida et al., *Cell* 1998] zwischen den sich entwickelnden Gliedmaßen werden im Laufe der Embryonalentwicklung durch Apoptose entfernt).

Es ließ sich also insgesamt feststellen, dass der Verlust von Apaf-1^{-/-} einen schwerwiegenderen Phänotyp verursachte als der von Caspase-9^{-/-} (Ein Vergleich dieser Apaf-1- und Caspase-9-Mutanten ist in Tab. 1 dargestellt). Dies ließ vermuten, dass es möglicherweise weitere Funktionen (und somit wahrscheinlich Interaktionspartner) von Apaf-1 bei der Apoptose gibt außer der Aktivierung von Procaspase-9 und dass das Fehlen dieser Funktionen den schwereren Phänotyp in den Apaf-1^{-/-}-Mutanten verursachte.

Die Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern von Apaf-1 würde möglicherweise zur Entdeckung weiterer Apoptosemechanismen führen, an denen Apaf-1 beteiligt wäre. Denkbar ist beispielsweise die Möglichkeit, dass Apaf-1 an weitere, noch unbekannte Caspasen binden könnte um diese zu aktivieren.

Für die Suche nach Interaktionspartnern von Apaf-1 wurden die DNA-Sequenzen der zwei funktionellen Domänen (CARD- und WD-40) des Apaf-1-Moleküls jeweils In-Frame mit der LexA-Sequenz kloniert und als „Köder“ im Interaction Trap-System eingesetzt.

Tab. 1: Vergleich von homozygoten Apaf-1- und Caspase-9-Knockout-Mäusen.

Dargestellt ist ein Vergleich der homozygoten Apaf-1- und Caspase-9-Mutanten, die von *Yoshida et al.* (Yoshida et al., *Cell* 1998) und *Hakem et al.* (Hakem et al., *Cell* 1998) generiert und beschrieben wurden. Neben einer hohen Sterblichkeit zeichnen sich die Mutanten vor allem durch eine anomale Gehirnentwicklung aus, die von einer Verringerung der Apoptose im ZNS begleitet wird.
E12,5-E15,5: Schwangerschaftstag.

	Anteil neugeborener, homozygoter knockout-Mäuse	Anteil der überlebenden, neugeborenen homozygoten Knockout-Mäuse	Auswirkungen der Mutationen	
			homozygote Embryonen und Neugeborene	Interdigitales Gewebe (Embryonen)
Genotyp: Apaf-1^{-/-}	11 von insgesamt 190 Neugeborenen (6 %)	weniger als 50% Überlebende	Hohe Sterblichkeit, verringerte Apoptose im ZNS, übermäßiges Hirnwachstum, Hervortreten von Gehirnteilen aus <u>vorderem u. hinterem</u> Schädelbereich sowie aus <u>Gesichtsbereich</u> . Beginn der morphologischen Anomalien: E12,5	Schwach ausgeprägte Gliedmaßen und verzögerter Abbau bei E13,5 (vordere) bzw. E15,5 (hintere). Ab E15,5 normale Ausprägung und Entfernung.
Casp.-9^{-/-}	7 von 100 Neugeborenen (7 %)	weniger als 50% Überlebende	Hohe Sterblichkeit, verringerte Apoptose im ZNS, übermäßiges Hirnwachstum, Hervortreten von Gehirnteilen aus vorderem Schädelbereich. Beginn der morphologischen Anomalien: E12,5	Unauffällig

2 Ergebnisse

2.1 Interaktionsstudien mit dem Interaction Trap-System

In diesem Abschnitt wird die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Interaction Trap-System beschrieben. Bei der Beurteilung, ob Interaktionen stattgefunden hatten, wurden die Hefekolonien, die „Köder“ und „Beute“ enthielten, auf Selektivmedien ausplattiert, die auf die Aktivität beider Reportergene selektionierten. Eine Beurteilung der Stärke von Interaktionen im Interaction Trap-System ist über die quantitative Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität des LacZ-Reportergens möglich, wobei sich starke Protein-Protein-Interaktionen durch eine entsprechende Erhöhung der β -Galactosidaseaktivität feststellen lassen (Gyuris et al., *Cell* 1993; Estojak et al., *Mol. Cell.Biol.* 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde die Stärke von Interaktionen zwischen Proteinen anhand der Intensität der Blaufärbungen in den betreffenden Hefeklonen beurteilt; es wurde davon ausgegangen, dass dabei eine proportionale Beziehung zur β -Galactosidaseaktivität besteht.

2.1.1 Ac-P35 interagiert mit einer RNA-Polymerase II-Untereinheit, hRPB11

Für die Suche nach Interaktionspartnern von Ac-P35 mit dem Interaction Trap-System (siehe Abschnitt 4. 2. 2. 1) wurde die kodierende Sequenz von Ac-P35 zunächst in die multiple Klonierungsstelle des Bait-Vektors pLexA202 subkloniert. Das auf diese Weise generierte Bait-Fusionsplasmid pLexA/p35 wurde DNA-sequenziert (Abschnitt 4. 2. 1. 12) um sicherzustellen, dass der von LexA vorgegebene Leserahmen erhalten blieb. Die Sequenzierung ergab, dass sich die kodierende Sequenz von Ac-P35 In-Frame mit der LexA-Sequenz befand (Abb. 4).

Anschließend wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48/pJK103 mit dem Bait-Fusionsplasmid pLexA/p35 transformiert, und Lysate dieser Transformanten wurden im Western Blot auf Anwesenheit des Fusionsproteins LexA/p35 geprüft. Die Western-Blot-Analyse ergab, dass das Bait-Fusionsprotein LexA-P35 in den mit dem Bait-Fusionsplasmid pLexA/p35 transformierten Hefezellen exprimiert wurde (Abb. 5). Durch Selektion auf die *LEU2*- und LacZ-Reportergenaktivitäten wurde das Bait-Fusionsplasmid pLexA/p35 auf unspezifische,

transaktivierende Aktivität geprüft. Eine unspezifische, transaktivierende Aktivität wurde ausgeschlossen, da die mit pLexA/p35 transformierten Hefeklonen nach Ausplattieren auf UHL⁻- und UHL⁻-X-Gal-Medium sowie mehrtägiger Inkubation keine Kolonien bzw. Blaufärbungen auf diesen Medien bildeten (nicht gezeigt).

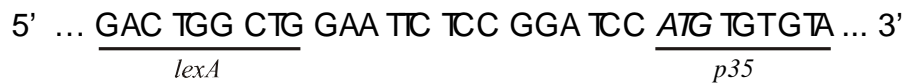


Abb. 4: Leserahmen im Fusionsplasmid pLexA/p35.

Dargestellt ist die Basenabfolge des kodierenden DNA-Stranges in der *lexA*-p35-Übergangsregion im Bait-Fusionsplasmid pLexA/p35. Der Leserahmen ist anhand der Basentriplets erkennbar. Die Gensequenzen von LexA und P35 sind durch Balken gekennzeichnet. Für die Sequenzierung wurde ein Primer verwendet, der in 5'-Richtung von der gezeigten Sequenz mit dem 3' → 5'-Strang hybridisierte.

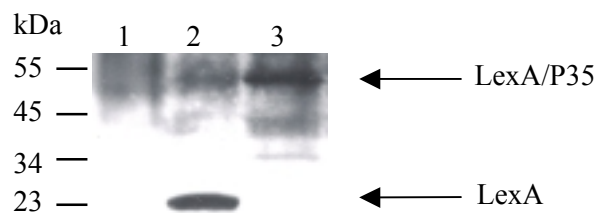


Abb. 5: Expression des LexA/P35-Proteins in *S. cerev.* EGY 48/pJK103.

Für die Western-Blot-Analyse wurden Zellen des Hefestammes *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48/pJK103 entweder mit dem Bait-Fusionsplasmid pLexA/p35 (Spur 3) oder dem Vektor pLexA202 (Positiv-Kontrolle, Spur 2) transformiert. Lysate der transformierten Klone wurden mit einem Antikörper (Anti-LexA), der gegen die Bindungsdomäne des LexA-Proteins gerichtet war, untersucht. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Lysat aus untransfizierten Hefezellen verwendet (Spur 1). Am linken Rand ist der Molekulargewichtsmarker eingezeichnet.

Nach der Prüfung auf unspezifische, transaktivierende Aktivität des Bait-Fusionsplasmids pLexA/p35 wurde *S. cerevisiae* EGY 48/pJK103/pLexA/p35 mit dem Vektor pYESTrp, der die Placenta- bzw. Jurkat-Genbibliothek enthielt, transformiert. Anschließend wurden die Transformanten auf *LEU2*- und LacZ-Reportergenaktivität selektioniert. In Abb. 6 sind am Beispiel eines Interaction Trap-Screens (Screen-Nr. 5_{12,1}) die auf UHWL⁻-X-Gal-Medium übertragenen Kolonien zur Selektion auf LacZ-Reportergenaktivität dargestellt. In den blauen Hefekolonien sind beide Reportergene (*LEU2* und LacZ) aktiviert, was auf eine Interaktion zwischen Ac-P35 und einem Protein aus der Genbank hindeutet. Eine Reihe von derart positiven

Kolonien wurde durch Abimpfen auf eine frische Agarplatte isoliert, und die entsprechenden pYESTrp-Vektoren (einschließlich der darin enthaltenen Genbanksequenzen) wurden isoliert. Diese Vektorspezies werden im folgenden als kX.x, die durch sie kodierten Proteine als KX.x bezeichnet.

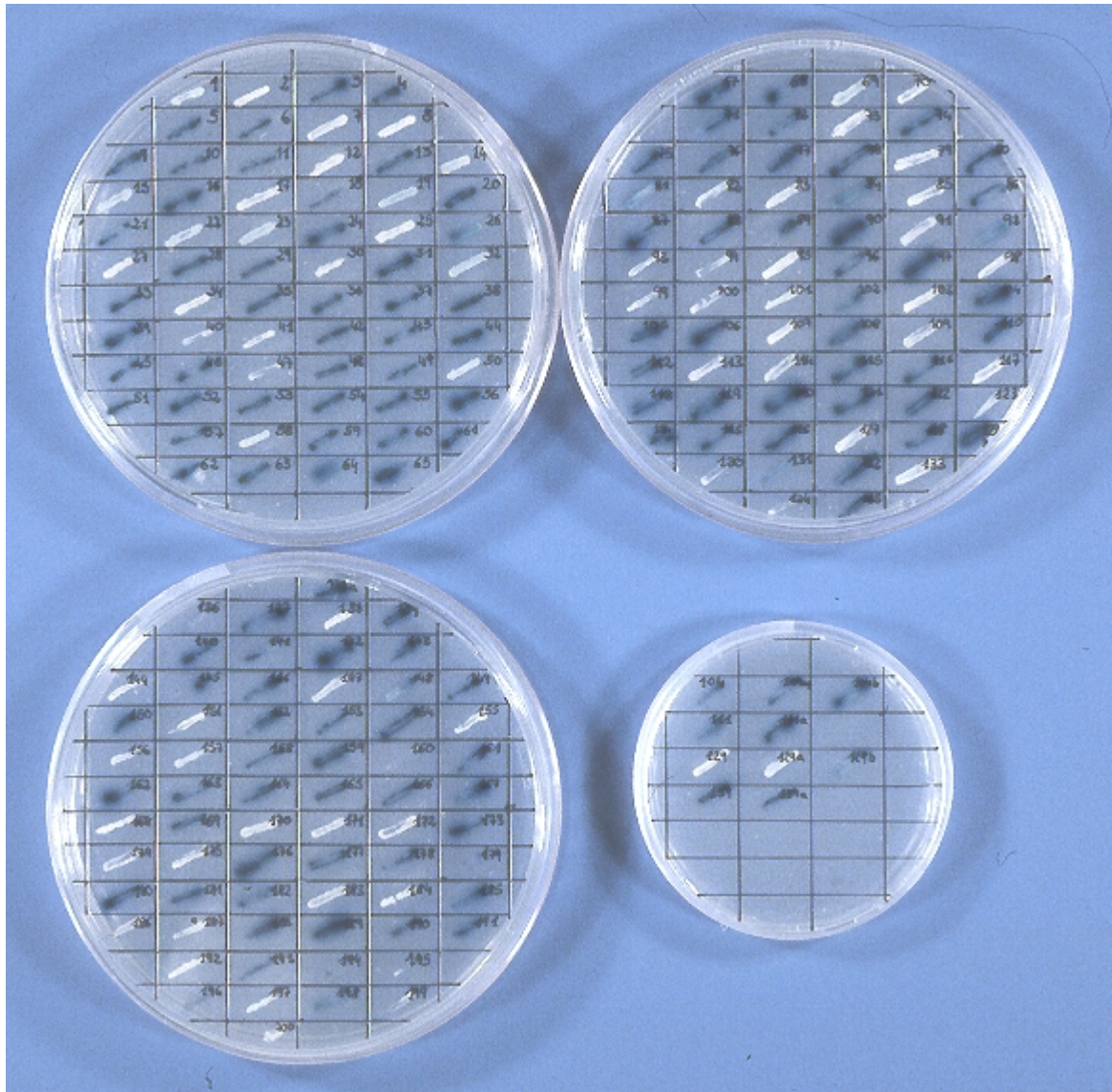


Abb. 6: Interaction Trap-Screen (Screen-Nr. 5_{12,1}). Selektion auf *LEU2*- und *LacZ*-Reportergenaktivität auf UHWL-X-Gal-Medium.

S. cerevisiae EGY 48/pJK103/pLexA/p35 wurde mit der im Vektor pYESTrp befindlichen Jurkat-Genbank transformiert. Die Transformanten wurden zunächst auf UHWL-Medium ausplattiert, um auf *LEU2*-Reportergenaktivität zu selektionieren (nicht gezeigt). Anschließend wurden einzelne Kolonien auf UHWL-X-Gal-Medium übertragen, um auf die *LacZ*-Reportergenaktivität zu prüfen. Weiße Kolonien stellen Hefeklonen dar, in denen nur das *LEU2*-Reportergen aktiv ist, während blaue Kolonien darstellen, in denen sowohl das *LEU2*- als auch das *LacZ*-Gen aktiv ist. Zur besseren Übersicht wurden die einzelnen Klone durchnummeriert.

Es wurden mehrere Interaction Trap-Screens durchgeführt, wobei jeder Screen eine spezifische Bezeichnung (als Screen-Nr. Xyz) erhielt. Dabei gibt X die Anzahl der jeweiligen Transformationen an, bei denen die Genbank in den Hefestamm eingeführt wurde, der das Bait-Plasmid enthielt (z. B. die insgesamt fünfte Genbank-Transformation bei Screen-Nr. 5_{12,1}). Die Variable y bezeichnet die Nummer desjenigen Klons, der für die Genbank-Transformation ausgewählt wurde (bei Screen-Nr. 5_{12,1}: Bait-Hefestamm Nr. 12, wobei die Nummerierung der Klone willkürlich erfolgte). Die dritte Variable z gibt die Anzahl der Reporter-gen-Screens an, die auf UHWL⁻ und UHWL⁻-X-Gal-Medium durchgeführt wurden (bei Screen-Nr. 5_{12,1}: der erste Reporter-gen-Screen auf UHWL⁻ und UHWL⁻-X-Gal). Bei der Suche nach Interaktionspartnern von Ac-P35 wurden insgesamt 5 Genbank-Transformationen und 8 Reporter-gen-Screens durchgeführt (siehe Tabelle 2).

Die Spezifität der Interaktionen in den blauen Kolonien wurde durch Rücktransformation der isolierten Interaktoren-DNA sowie des Fusionsplasmids pJG4-5/GABI in *Saccharomyces cerev.* EGY48/pJK103/pLexA/p35 und *Saccharomyces cerev.* EGY 48/pJK103/Integrin β_7 überprüft. Als ausschlaggebend für die Beurteilung von Interaktionen wurde die gleichzeitige Aktivierung beider Reportergene, *LEU2* und *LacZ* nach Übertragung auf UHWL⁻-X-Gal-Medium betrachtet. In Abb. 7 ist am Beispiel des Interaction Trap-Screens Nr. 5_{12,1} die Spezifität der Interaktion von Ac-P35 mit Proteinen aus der Genbank anhand der *LEU2*- und der *LacZ*-Reporter-gen-Aktivitäten dargestellt (Agarplatte A). Diese Annahme einer spezifischen Interaktion wird durch den Befund unterstützt, dass zum einen LexA/P35 nicht mit dem Protein B42/GABI interagiert (in A, links oben), zum anderen die Interaktionspartner von Ac-P35, K64.4, K96.11, K194.11 und K95.1 nicht mit dem Protein LexA/Integrin β_7 interagieren (in B). Die beschriebene, spezifische Interaktion zwischen den Proteinen Integrin β_7 und GABI (Rietzler et al., *J Biol Chem* 1998) ist anhand der Blaufärbung des betreffenden Hefeklons (in B, links oben) zu erkennen und diente in diesem Experiment als Positiv-Kontrolle für eine spezifische Interaktion.

Die cDNA-Sequenzen der nach Rücktransformation ermittelten spezifischen Interaktionspartner von Ac-P35 wurden sequenziert und wie in Abschnitt 4. 2. 2. 1. 2, Punkt 8 beschrieben, identifiziert. Für den Interaction Trap-Screen Nr. 5_{12,1} ergab die Gen-Datenbanksuche, dass es sich bei der ermittelten DNA-Sequenz des Interaktor-Proteins K64.4 um die cDNA-Sequenz für die korrespondierende mRNA-Sequenz der humanen RNA-Polymerase II-Untereinheit 11, hRPB11, handelte (NCBI, Accession No. L37127). In Abb. 8 ist die cDNA-Sequenz von K64.4, wie sie nach der Sequenzierung ermittelt wurde, wiedergegeben.

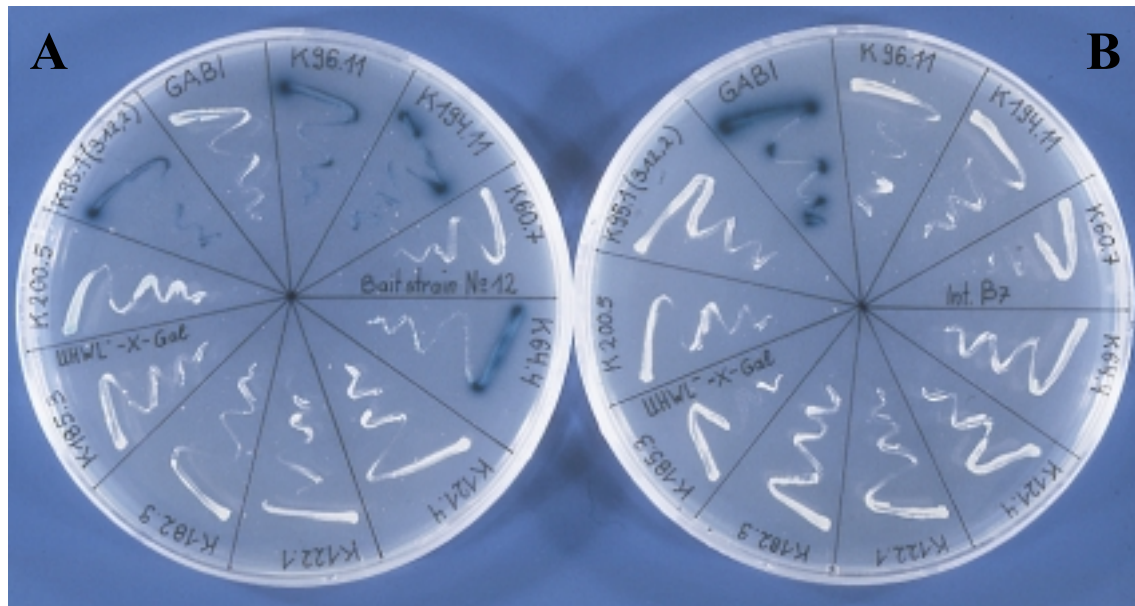


Abb. 7: Überprüfung der Spezifität der Interaktionen auf UHWL⁻-X-Gal-Medium (Screen 5_{12,1}).

Nach der Selektion auf *LEU2*- und LacZ-Reportergenaktivität in dem Screen 5_{12,1} (vgl. Abb. 6) wurden aus einigen blauen Hefeklonen die Interaktor-DNA isoliert und diese in *S. cerev.* EGY 48/ pJK103/ pLexA/p35 (exprimiert das Fusionsprotein LexA/P35) zurücktransformiert **(A)**. Zusätzlich wurden diese Interaktor-Plasmide in *S. cerev.* EGY 48/pJK103/Integrin β_7 (exprimiert das Fusionsprotein LexA/Integrin β_7) transformiert **(B)**. Im weiteren wurde das Fusionsplasmid pJG4-5/GABI ebenfalls in *S. cerev.* EGY 48/pJK103/pLexA/p35 (Negativ-Kontrolle, **A**) und *S. cerev.* EGY 48/pJK103/Integrin β_7 (Positiv-Kontrolle, **B**) transformiert.

Wie anhand ihrer intensiven Blaufärbung auf dem Selektivmedium zu erkennen ist, interagieren die Proteine der aus den blauen Klonen Nr. 64, Nr. 96, Nr. 194 sowie Nr. 95 isolierten Interaktor-DNAs spezifisch und intensiv mit Ac-P35 **(A)**, jedoch nicht mit dem Integrin β_7 -Protein **(B)**. Umgekehrt interagiert das Protein GABI spezifisch mit dem Integrin β_7 -Protein **(B, links oben)**, nicht aber mit dem Protein Ac-P35 **(A, links oben)**.

K200.5 wurde als zusätzliche Negativ-Kontrolle eingesetzt; seine cDNA-Sequenz wurde aus einem *LEU2*-positiven, jedoch LacZ-negativen Klon isoliert.

Alle anderen aus dem Screen 5_{12,1} gezogenen Interaktoren interagieren nicht spezifisch mit Ac-P35: die Hefekolonien zeigten keine Blaufärbung **(A)**.

K95.1 wurde als zusätzliche Positiv-Kontrolle eingesetzt; seine cDNA-Sequenz wurde aus einem *LEU2*- und LacZ-positiven Klon eines früheren Interaction Trap-Screens (Nr. 3_{12,2}) isoliert. Nachdem die spezifische Interaktion zwischen K95.1 und Ac-P35 bestätigt worden war, wurde dieses Paar in den weiteren Screens als Positiv-Kontrolle mitgeführt.


```

      5'-pYESTrp - GGA CGC GAC GGC GGC GGG ACG ATG AAC GCC CCT CCA GCC TTC GAG
46  TCG TTC TTG CTC TTC GAG GGC GAG AAG AAG ATC ACC ATT AAC AAG GAC ACC AAG
100 GTA CCC AAT GCC TGT TTA TTC ACC ATC AAC AAA GAA GAC CAC ACA CTG GGA AAC
154 ATC ATT AAA TCA CAA CTC CTA AAA GAC CCG CAA GTG CTA TTT GCT GGC TAC AAA
208 GTC CCC CAC CCC TTG GAG CAC AAG ATC ATC ATC CGA GTG CAG ACC ACG CCG GAC
262 TAC AGC CCC CAG GAA GCC TTT ACC AAC GCC ATC ACC GAC CTC ATC AGT GAG CTG
316 TCC CTG CTG GAG GAG CGC TTT CGG GTG GCC ATA AAA GAC AAG CAG GAA GGA ATT
370 GAG TAG GGG CCA GAG GGG GCT CTG CTC GGC CTG TGA GCC CCG TTC CTA CCT GTG
424 CCT GAC CCT CCG CTC CAG GTA CCA CAC CGA GGA GAG CGG CCG GTC CCA GCC ATG
478 GCC CGC CTT GTG GCCACC - pYESTrp-3'

```

Abb. 8: cDNA-Sequenz von K64.4.

Die Interaktor-DNA aus Klon Nr. 64 wurde angereinigt und unter Verwendung des Primers YES-S sequenziert. Der Leserahmen ist anhand der Basentriplets erkennbar und wird von pYESTrp vorgegeben. Die gezeigte Sequenz enthält ein ATG-Start- sowie ein TAG-Stop-Codon (in Fettdruck). Die dazwischen liegende kodierende Region mit einer Länge von 351 Basenpaaren ist kursiv dargestellt. Die Gesamtlänge der cDNA-Sequenz inklusive der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen beträgt 495 Basenpaare.

Die Identität der übrigen spezifischen Interaktionspartner des Screens 5_{12,1}, K96.11 und K194.11, wurde mit Hilfe der PCR ermittelt. Dazu wurden die Klone Nr. 96 und Nr. 194 (vgl. Abb. 6) unter Verwendung der hRPB11-spezifischen Primer hRPB11-Slex und hRPB11-AS einer PCR unterworfen (Abschnitt 4. 2. 1. 6; als Template für die Reaktion wurden mit Hilfe einer Mikropipettenspitze Hefezellen von den Kolonien abgetragen und direkt zu dem Reaktionsansatz gegeben). Aus den Klonen Nr. 96 und Nr. 194 konnten durch die PCR sowie nach Agarosegel-Elektrophorese und UV-Detektion je eine Bande von ca. 350 Basenpaaren Länge erhalten werden, was der kodierenden Region von hRPB11 entsprach und somit die Anwesenheit von hRPB11 in diesen *LEU2*- und *LacZ*-positiven Klonen bestätigte (nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurden Hefeklone untersucht, die im Interaction Trap-Screen 5_{12,1} keine Blaufärbung aufwiesen. Diese Klone lieferten mit den spezifischen Primern hRPB11-Slex und hRPB11-AS keine PCR-Banden (nicht gezeigt). Daraus konnte geschlossen werden, dass es sich auch bei K96.11 und K194.11 aus den Klonen Nr. 96 und Nr. 194 um die RNA-Polymerase II-Untereinheit 11 des Menschen handelte.

Die abgeleitete Proteinsequenz von hRPB11 ist in Abb. 9 wiedergegeben, die (berechnete) rel. Molekülmasse M_r beträgt 13 292.62 (Fanciulli et al., 1996).

```

1  MNAPPAFESF LLFEGEKKIT INKDTKVPNA CLFTINKEDH
41  TLGNI IKSQ LKDPQVLFAG YKVPHPLEHK I IIRVQTTPD
81  YSPQEAF TNA ITDLISELSL LEERFRVAIK DKQEGIE

```

Abb. 9: Proteinsequenz von hRPB11.

Gezeigt ist die Proteinsequenz der Polymerase II-Untereinheit 11 des Menschen, wie sie sich aus der kodierenden Region der cDNA-Sequenz herleitet (NCBI, Accession No. 37127).

Von den acht durchgeführten Reporter-Screens wurden insgesamt 18 Interaktor-Proteine (aus einer Gesamtanzahl von 268 blauen Kolonien) auf ihre spezifische Interaktion mit Ac-P35 geprüft³.

Die Hälfte dieser rücktransformierten Interaktoren führte in dem Hefestamm *S. cerev.* EGY 48/pJK103/ pLexA/p35 zur Aktivierung der *LEU2*- und *LacZ*-Reportergene.

Von diesen spezifischen Interaktoren wurden sieben Plasmide sequenziert (zwei spezifische Interaktoren, K96.11 und K194.11 aus Screen Nr. 5_{12,1}, wurden wie oben beschrieben mittels PCR untersucht). Alle sieben Interaktoren wurden nach der Gen-Datenbanksuche als hRPB11 identifiziert (siehe Tab. 2).

Es konnte kein zweiter Interaktionspartner von Ac-P35 gefunden werden, jedoch wurde bei allen durchgeführten Reporter-Screens und in allen spezifischen *LacZ*-positiven Klonen der Interaktionspartner hRPB11 gefunden. Auch war die Anzahl an blauen Kolonien im allgemeinen relativ hoch, so dass man davon ausgehen kann, dass viele oder die meisten der in der Genbank vorhandenen Kopien von hRPB11 hier gefunden wurden. Zusammen mit der Beobachtung, dass diese Interaktion eine starke Blaufärbung (was als entsprechend starke Interaktion gedeutet wurde) der Hefekclone verursachte, lässt den Schluss zu, dass sie physiologisch bedeutsam sein könnte.

In Experimenten mit gereinigten RNA-Polymerase II-Untereinheiten konnte beobachtet werden, dass ein Komplex, bestehend aus RPB11 und zwei weiteren Untereinheiten, in wässriger Lösung an doppelsträngige DNA binden konnte (Kimura et al., *J Biol Chem* 1997). Um auszuschließen, dass hRPB11 im Interaction Trap-System an die LexA-Operator-Sequenzen stromaufwärts der Reportergene *LEU2* und *LacZ* gebunden und somit zusammen mit der Aktivierungs-Domäne B42 die Expression der Reportergene unspezifisch aktiviert hatte, wurde es in den Bait-Vektor pLexA202 In-Frame subkloniert und mit dem Prey-Fusionsplasmid pJG4-5/p35 in *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34 transformiert.

³ Die den 18 Interaktor-Proteinen entsprechenden Plasmide aus den blauen Kolonien wurden wie unter Abschnitt 4. 2. 1. 2, Punkt 7 beschrieben aufgrund der Verschiedenheit (in der Größe) ihrer PCR-Produkte für die Isolation und Anreinigung ausgewählt. In ihnen waren verschieden lange cDNAs enthalten (im Größenbereich von ~350 bis ~1000 Bp), die in ihrer Gesamtheit die Heterogenität der potentiellen Interaktoren (bezüglich der cDNA-Längen) aus der Genbank repräsentierten. Es fiel auf, dass der gefundene Interaktionspartner hRPB11 in allen Screens ein PCR-Produkt von ~750 Bp lieferte. Bei den cDNAs der unspezifisch interagierenden Proteine handelte es sich, soweit festgestellt wurde, um Gensequenzen von ribosomalen Proteinen und um Sequenzen von EST-Klonen.

Das in diesem Hefestamm exprimierte Fusionsprotein LexA/ hRPB11 sollte ohne die Aktivierungsdomäne B42 nicht in der Lage sein, die Reportergene unspezifisch zu aktivieren, so dass eine Aktivierung der Reportergene nur aufgrund der Inter-aktion zwischen hRPB11 und Ac-P35 erfolgen konnte. Nach Transformation der Hefezellen konnten sowohl Wachstum als auch Blaufärbung der Hefekolonien auf UHWL⁻-X-Gal-Medium nur dann beobachtet werden, wenn sowohl LexA-hRPB11 als auch B42-P35 anwesend waren (Abb.10). Zusammen mit den oben beschriebenen Kontrollen machen diese Befunde eine unspezifische Aktivierung der Reportergene *LEU2* und *LacZ* durch LexA/hRPB11 sehr unwahrscheinlich.



Abb. 10: hRPB11 interagiert spezifisch mit Ac-P35.

Die kodierenden Sequenzen von hRPB11 und Ac-P35 wurden In-Frame in die Vektoren pLexA202 und pJG4-5 subkloniert und in *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34 ko-transformiert. Die Transformanten wurden anschließend zur Überprüfung der Reportergenaktivitäten auf UHWL⁻-X-Gal-Medium abgeimpft. Gezeigt sind Wachstum und β -Galactosidaseaktivität eines solchen Hefeklons auf UHWL⁻-X-Gal-Medium (links). Die intensive Blaufärbung deutet auf eine starke Interaktion hin. Als Negativ-Kontrolle (rechts) ist ein Klon gezeigt, in dem die Plasmide pYESTrp/hRPB11 und pLexA/C-p35 transformiert wurden und für die Proteine B42/hRPB11 und LexA/C-P35 kodieren. In diesem Klon findet keine Interaktion dieser Proteine statt.

Um zu untersuchen, ob Ac-P35 über sein N- bzw. C-terminales Ende mit hRPB11 interagiert, wurden Deletionsmutanten, die nur die N- bzw. C-terminale Hälfte des Ac-P35-Proteins umfassten (N-P35 bzw. C-P35), als Fusionsproteine mit LexA oder B42 im Zuge eines Interaction Trap-Experiments in *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34 exprimiert und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, mit dem hRPB11-Protein zu interagieren. Es konnte beobachtet werden, dass N-P35, nicht jedoch C-P35 mit hRPB11 interagiert (Abb. 11). Dies ließ vermuten, dass Ac-P35 über seinen N-Terminus mit hRPB11 interagiert.

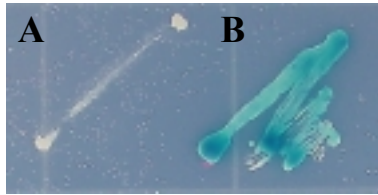


Abb. 11: Die N-terminale Hälfte von Ac-P35 interagiert mit hRPB11.

Die N-terminale (Aminosäure 1-147) bzw. C-terminale (Aminosäure 132-299) Hälften der kodierenden Sequenz von Ac-P35 wurden in die Interaction Trap-Vektoren pJG4-5 bzw. pLexA202 In-Frame subkloniert und zusammen mit den Fusionsplasmiden pLexA/hRPB11 bzw. pYESTrp/hRPB11 in *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34 transformiert. Die Transformanten wurden anschließend zur Überprüfung der Reportergenaktivitäten auf UHWL⁻-X-Gal-Medium abgeimpft. Gezeigt sind Wachstum und β-Galactosidaseaktivität auf UHWL⁻-X-Gal-Medium.

A: C-P35 interagiert nicht mit hRPB11. Die Expression der Fusionsproteine LexA/C-P35 und B42/hRPB11 in *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34 führt nicht zur Aktivierung der *LEU2*- und *LacZ*-Reportergene; dies ist anhand des mangelnden Wachstums und des Fehlens von β-Galactosidaseaktivität eines abgeimpften Klons auf UHWL⁻-X-Gal-Medium zu erkennen.

B: N-P35 interagiert mit hRPB11. Die Expression der Fusionsproteine LexA/hRPB11 und B42/N-P35 in *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34 führt zur Aktivierung der *LEU2*- und *LacZ*-Reportergene; dies ist anhand des Wachstums sowie der β-Galactosidaseaktivität auf UHWL⁻-X-Gal-Medium eines abgeimpften Klons zu erkennen. Die intensive Blaufärbung deutet auf eine starke Interaktion hin.

2. 1. 2 Ac-P35 und hRPB11 bilden Homodimere

Aufgrund der vermuteten Dimerisierung des postulierten zellulären P35-Proteins und die im Western-Blot auftretenden höher molekularen Ac-P35-Banden (siehe Problemstellung) wurde davon ausgegangen, dass Ac-P35 mit hoher Wahrscheinlichkeit mit sich selbst Dimere bilden kann.

Die Fähigkeit von Ac-P35 zu dimerisieren wurde untersucht, indem die Fusionsplasmide pLexA/p35 und pJG4-5/p35, die für die Fusionsproteine LexA/P35 und B42/P35 kodierten, in *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34 ko-transfiziert und der transformierte Hefestamm auf UHWL⁻-X-Gal-Medium selektioniert wurde. Die transformierten Hefezellen zeigten sowohl ein Wachstum als auch β-Galactosidaseaktivität auf UHWL⁻-X-Gal-Medium, was auf eine Interaktion zwischen jeweils zwei Ac-P35-Molekülen hindeutete (Abb. 12).

Im Weiteren wurde untersucht, ob an dieser Interaktion der N- oder C-terminale Teil des Proteins beteiligt und hinreichend war. Dazu wurde *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34 jeweils ko-transfiziert mit den Fusionsplasmiden pLexA/N-p35 und pJG4-5/p35 oder pLexA/C-p35 und pJG4-5/p35. Diese Plasmide kodierten für die Fusionsproteine von N-P35 bzw. C-P35 mit LexA

sowie für das Fusionsprotein von Ac-P35 mit B42. Nach Selektion der transformierten Hefezellen auf UHWL⁻ X-Gal-Medium konnte festgestellt werden, dass beide Deletionsmutanten von Ac-P35 mit dem Gesamtmolekül interagierten, die Interaktion zwischen C-P35 und Ac-P35 jedoch schwächer war als die Interaktion zwischen N-P35 und Ac-P35 (Abb. 13).

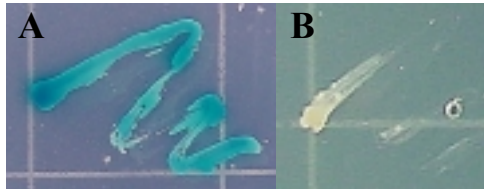


Abb. 12: Ac-P35 bildet Homodimere.

Gezeigt ist das Wachstum sowie die Blaufärbung eines auf UHWL⁻ X-Gal-Medium abgeimpften Klons, der mit pLexA/p35 und pJG4-5/p35 transformiert wurde (**A**). Das Wachstum und die β -Galactosidaseaktivität dieses Klons ist ein Beweis für die im Zellkern stattfindende Interaktion zwischen jeweils zwei P35-Molekülen. Die Intensität der Blaufärbung deutet auf eine starke Interaktion hin.

Als Negativ-Kontrolle ist ein Klon gezeigt, in dem die Plasmide pLexA/p35 und pYESTrp/k15.7 transformiert wurden und für die Proteine LexA/P35 und einem aus den CARD-Screens (s. u.) gezogenen unspezifischen Interaktor kodieren (**B**).

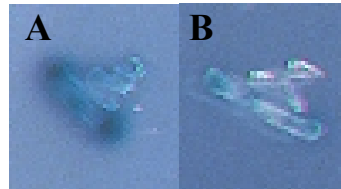


Abb. 13: N- und C-P35 interagieren in unterschiedlicher Stärke mit Ac-P35.

Gezeigt ist das Wachstum sowie die Blaufärbung eines auf UHWL⁻ X-Gal-Medium abgeimpften Klons, der mit pLexA/N-p35 und pJG4-5/p35 transformiert wurde (**A**). Das Wachstum und die β -Galactosidaseaktivität dieses Klons ist ein Hinweis auf die im Zellkern stattfindende Interaktion zwischen dem N-terminalen Anteil von Ac-P35 und dem vollständigen Molekül. Die Intensität der Blaufärbung deutet auf eine starke Interaktion hin.

Das Wachstum und die β -Galactosidaseaktivität dieses mit pLexA/C-p35 und pJG4-5/p35 transformierten Klons auf UHWL⁻ X-Gal-Medium (**B**) ist ein Beweis für die Interaktion zwischen dem C-terminalen Anteil von Ac-P35 und dem vollständigen Molekül, jedoch scheint hier die Interaktion (verglichen mit derjenigen in **A**) aufgrund der geringeren Intensität der Blaufärbung schwächer zu sein.

Die Experimente mit dem P35-Protein wurden weitergeführt, in dem die Homodimerisierung des N-terminalen Teiles als auch die Heterodimerisierung zwischen dem N- und C-terminalen Teil des Moleküls untersucht wurden. Dabei zeigte sich, dass der N-Terminus von Ac-P35 nicht mit sich selbst interagiert, wohl aber mit dem C-terminalen Teil des Proteins, auch wenn diese Interaktion relativ schwach zu sein schien (Abb. 14).

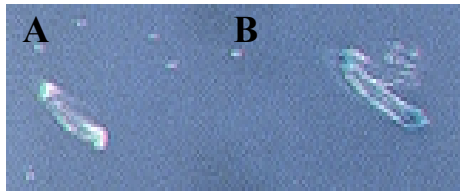


Abb. 14: N-P35 interagiert mit C-P35.

- A:** Gezeigt ist ein auf UHWL⁻ X-Gal-Medium abgeimpfter Klon, der mit den Fusionsplasmiden pLexA/N-p35 und pJG4-5/N-p35, die für die Fusionsproteine LexA/N-P35 und B42/N-P35 kodieren, transformiert wurde. Das mangelnde Wachstum und die fehlende β -Galactosidaseaktivität dieses Klons zeigen, dass N-P35 nicht homodimerisiert.
- B:** Gezeigt ist das Wachstum sowie die Blaufärbung eines auf UHWL⁻ X-Gal-Medium abgeimpften Klons, der mit pLexA/C-p35 und pJG4-5/N-p35, die für die Fusionsproteine LexA/C-P35 und B42/N-P35 kodieren, transformiert wurde. Das Wachstum und die β -Galactosidaseaktivität dieses Klons ist ein Hinweis auf die im Zellkern stattfindende Interaktion zwischen dem N- und C-terminalen Teil von Ac-P35. Die relativ geringe Ausprägung der Blaufärbung sowie das relativ geringe Maß an Wachstum deuten auf eine eher schwache Interaktion hin.

Aus den gewonnenen Daten kann geschlossen werden, dass Ac-P35 im Interaction Trap-System homodimerisieren kann und dass die Interaktion zwischen jeweils zwei P35-Monomeren unter Beteiligung der N- und C-terminalen Hälften dieser Monomere erfolgt; wahrscheinlich kommt es dabei zu einer Bindung zwischen dem N-terminalen Ende des einen Moleküls und dem C-terminalen Ende des zweiten P35-Monomers.

Weitere Interaction Trap-Experimente, die mit dem hRPB11-Protein durchgeführt wurden zeigten, dass hRPB11 mit sich selbst interagieren konnte (Abb. 15).



Abb. 15: Homodimerisierung von hRPB11

Das Wachstum und die β -Galactosidaseaktivität eines auf UHWL⁻ X-Gal-Medium abgeimpften Klons ist dargestellt (links). Dieser Klon wurde zuvor mit pLexA/hRPB11 und pYESTrp/RPB11, die für die Fusionsproteine LexA/hRPB11 und B42/RPB11 kodieren, transformiert. Das starke Wachstum und die β -Galactosidaseaktivität dieses Klons ist ein Hinweis für die im Zellkern stattfindende Interaktion zwischen jeweils zwei hRPB11-Molekülen. Die Intensität der Blaufärbung deutet auf eine starke Interaktion hin. Letztere ist spezifisch, da das hRPB11-Protein in der Negativ-Kontrolle (rechts; enthält die Plasmide pYESTrp/hRPB11 und pLexA/C-p35) nicht mit einem anderen Protein (dem C-Terminus von Ac-P35) interagiert.

2. 1. 3 Die CARD-Domäne von Apaf-1 interagiert mit einem Teil des humanen Proteins hVPS41

Aus einem Vergleich der Phänotypen von Apaf-1^{-/-}- und Caspase-9^{-/-}-Knockout-Mäusen konnte festgestellt werden, dass die Apaf-1^{-/-}-Knockout-Tiere insgesamt einen schwerwiegenden Phänotyp aufwiesen. Dies bedeutet, dass Apaf-1 neben der Aktivierung von Caspase-9 möglicherweise noch weitere Funktionen besitzt; es wurde angenommen, dass Apaf-1 auch mit weiteren zellulären Proteinen interagieren kann (siehe Problemstellung).

Für die Suche nach Interaktionspartnern von Apaf-1 mit dem Interaction Trap-System wurden die Sequenzen der CARD- und WD-40 Domänen von Apaf-1 jeweils in die multiple Klonierungsstelle des Bait-Vektors pLexA202 subkloniert. Dies geschah mit Hilfe von konventionellen Klonierungstechniken (siehe Abschnitt 4. 2. 1. 11), wobei die Sequenzen mittels PCR aus dem Plasmid pcDNA3/Apaf-1 herausamplifiziert und in pLexA202 ligiert wurden. Die auf diese Weise generierten Bait-Fusionsplasmide pLexA/CARD(Apaf-1) und pLexA/WD-40(Apaf-1) wurden sequenziert um sicherzustellen, dass der von LexA vorgegebene Leserahmen erhalten blieb, und dass durch die PCR keine Mutation eingeführt worden war. Die Sequenzierungen ergaben, dass die kodierenden Sequenzen der beiden Apaf-1-Domänen korrekt kloniert worden waren, so dass nun für ein kontinuierliches Fusionsprotein kodiert wurde (nicht gezeigt). Anschließend wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48/pSH18-34 jeweils mit pLexA/CARD(Apaf-1) und pLexA/WD-40(Apaf-1) transformiert, und Lysate dieser Transformanten wurden im Western Blot auf Anwesenheit der entsprechenden Fusionsproteine geprüft (analog Abschnitt 4. 2. 2. 1. 2, Punkte 2 und 3). Die Western-Blot-Analyse ergab, dass die Bait-Fusionsproteine LexA/CARD(Apaf-1) und LexA/WD-40(Apaf-1) in den transformierten Hefezellen exprimiert wurden (Abb. 16, nur für CARD-Domäne gezeigt). Durch Selektion auf die *LEU2*- und *LacZ*-Reportergenaktivitäten wurden die Bait-Fusionsplasmide pLexA/CARD (Apaf-1) und pLexA/WD-40(Apaf-1) jeweils auf unspezifische, transaktivierende Aktivität geprüft (analog Abschnitt 4. 2. 2. 1. 2, Punkt 4). Eine unspezifische, transaktivierende Aktivität beider Plasmide wurde nicht gemessen; die mit ihnen transformierten Hefeklonen bildeten nach Ausplattieren auf UHL⁻- und UHL⁻-X-Gal-Medium und mehrtägiger Inkubation keine Kolonien bzw. Blaufärbungen auf diesen Medien (nicht gezeigt). Die nach Transformation mit den Bait-Fusionsplasmiden pLexA/CARD(Apaf-1) und pLexA/WD-40(Apaf-1) erhaltenen Bait-Hefestämme *S. cerevisiae* EGY 48/pSH18-34/pLexA/CARD(Apaf-1) und *S. cerevisiae*

EGY 48/pSH18-34/pLexA/WD-40(Apaf-1) wurden anschließend mit dem Vektor pYESTrp, der die Placenta-Genbibliothek enthielt, wie unter Abschnitt 4. 2. 2. 1. 2, Punkt 5, transformiert. Danach wurden die Transformanten wie unter Abschnitt 4. 2. 2. 1. 2, Punkt 6 auf *LEU2*- und LacZ-Reportergenaktivität selektioniert. Es konnten auf UHWL⁻-X-Gal-Medium insgesamt 46 (CARD-Domäne) bzw. 40 (WD-40-Domäne) blaue Kolonien aus den durchgeführten Interaction Trap-Screens erhalten werden (siehe Tab. 2).

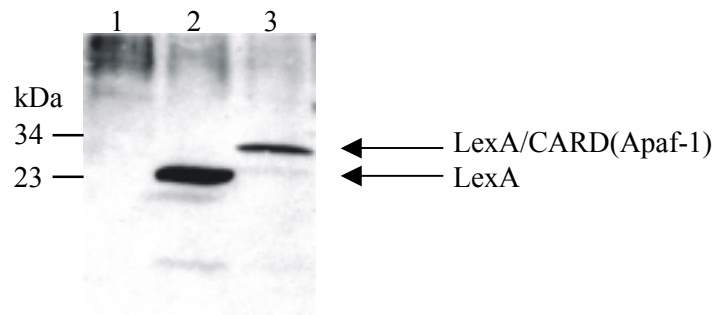


Abb. 16: Expression des LexA/CARD(Apaf-1)-Fusionsproteins in *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34.

Für die Western-Blot-Analyse wurden Zellen des Hefestammes *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48/pSH18-34 jeweils mit dem Bait-Fusionsplasmid pLexA/CARD(Apaf-1) [Spur 3] sowie dem Vektor pLexA202 (Positiv-Kontrolle, Spur 2) transformiert. Lysate der transformierten Klone wurden mit einem Antikörper (Anti-LexA), der gegen die Bindungsdomäne des LexA-Proteins gerichtet war, untersucht. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Lysat aus untransfizierten Hefezellen verwendet (Spur 1). Am linken Rand ist der Molekulargewichtsmarker eingezeichnet.

Die Spezifität der Interaktionen in den blauen Kolonien wurde durch Rücktransformation der isolierten Interaktoren-DNA sowie des Fusionsplasmids pYESTrp/hRPB11 (k95.1) in *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34/pLexA/CARD(Apaf-1) bzw. *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34/pLexA/WD-40 (Apaf-1) und *S. cerev.* EGY 48/pJK103/pLexA/p35 überprüft. Ausschlaggebend für die Beurteilung von Interaktionen wurde die gleichzeitige Aktivierung beider Reportergene, *LEU2* und LacZ nach Abimpfen auf UHWL⁻-X-Gal-Medium angesehen.

In Abb. 17 ist am Beispiel der Interaction Trap-Screens CARD₁ und CARD₂ die Spezifität der Interaktion des Fusionsproteins LexA/CARD(Apaf-1) mit einem Protein aus der Genbank anhand der *LEU2*- und der LacZ-Reportergenaktivitäten dargestellt (in B, rechts oben). Die Spezifität dieser Interaktion wird durch folgende Befunde unterstützt: zum einen interagiert LexA/CARD(Apaf-1) in diesem Experiment nicht mit dem Fusionsprotein B42/hRPB11 (in B, links unten), zum anderen interagiert der Interaktionspartner des LexA/CARD(Apaf-1)-Proteins, das Protein K9.5, nicht mit dem Protein LexA/P35 (in A, rechts oben). Die beschriebene spezifische Interaktion zwischen Ac-P35 und hRPB11 (s. o.) ist anhand der Blaufärbung des betreffenden Hefeklons (in A, links unten) zu erkennen und diente in diesem Experiment als Positiv-Kontrolle für eine spezifische Interaktion.

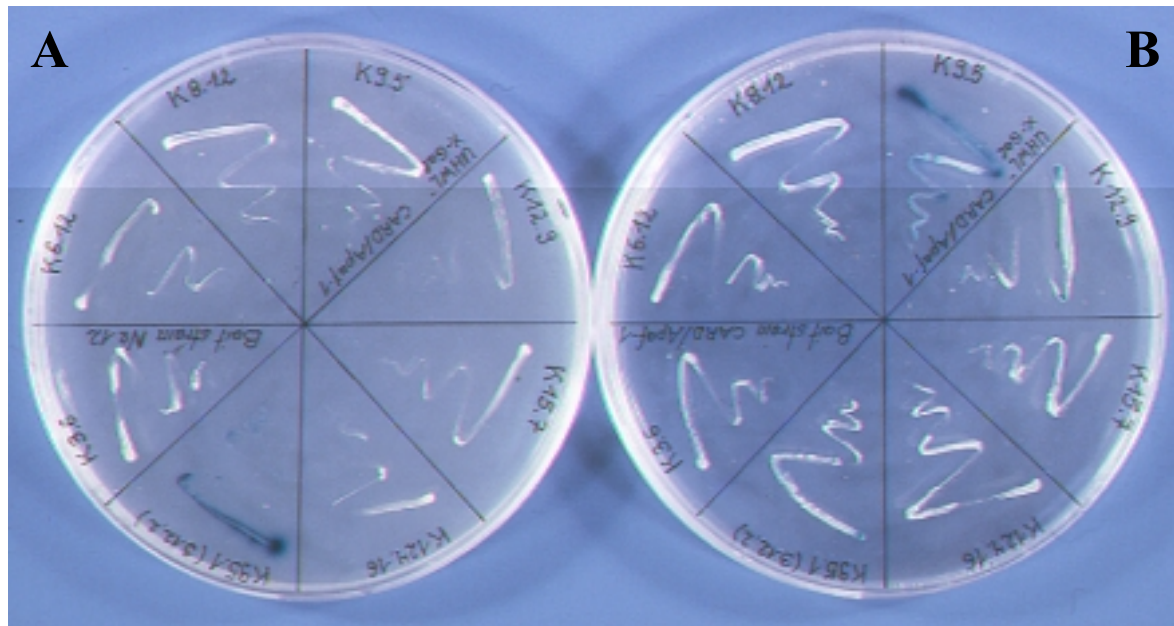


Abb. 17: Überprüfung der Spezifität der Interaktionen auf UHWL⁻-X-Gal-Medium (Screen CARD₁/CARD₂).

Nach der Selektion auf *LEU2*- und LacZ-Reportergenaktivität in den Screens CARD₁ und CARD₂ wurden aus einigen blauen Hefeklonen die Interaktor-DNA isoliert und diese in *S. cerev.* EGY 48/ pSH18-34/pLexA/CARD(Apaf-1) zurücktransformiert (**B**). Zusätzlich wurden diese Interaktor-Plasmide in *S. cerev.* EGY 48/pJK103/pLexA/p35 transformiert (**A**). Im Weiteren wurde das Fusionsplasmid pYESTrp/hRPB11 (k95.1) ebenfalls in *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34/pLexA/CARD(Apaf-1) [Negativ-Kontrolle, **B**] und *S. cerev.* EGY 48/pJK103/pLexA/p35 (Positiv-Kontrolle, **A**) transformiert.

Wie anhand der Blaufärbung des auf dem Selektivmedium gewachsenen Klons zu erkennen ist, interagiert das Protein des aus dem blauen Klon Nr. 9 isolierten Interaktor-Plasmids k9.5 spezifisch mit der CARD-Domäne von Apaf-1 (in **B**, rechts oben), jedoch nicht mit dem Ac-P35-Protein des Hefestammes *S. cerev.* EGY 48/pJK103/pLexA/p35 (in **A**, rechts oben). Umgekehrt interagiert das hRPB11-Protein K95.1 spezifisch mit Ac-P35 (in **A**, links unten), nicht aber mit der CARD-Domäne von Apaf-1 (in **B**, links unten).

Alle weiteren, aus den Screens CARD₁ und CARD₂ gezogenen Interaktoren interagieren nicht spezifisch mit der CARD-Domäne von Apaf-1, da die entsprechenden Hefekolonien zeigen keine oder vernachlässigbar geringe Blaufärbung aufweisen (in **B**).

Aus der Plasmid-DNA des Interaktionspartners K9.5⁴ wurde eine Midipräparation gemacht und aus dieser die DNA präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde dann zusammen mit dem Sequenzierprimer YES-S an die Firma MWG Biotech, Ebersberg zur Sequenzierung verschickt. Als Resultat der Sequenzierung wurde eine cDNA-Sequenz erhalten, die einen Bereich von 589 Basenpaaren umfasste und bei der Gen-Datenbanksuche eine 100 % ige Übereinstimmung mit dem 3'-Ende der cDNA-Sequenz des humanen Proteins VPS41 (hVPS41) zeigte.

⁴ Das Interaktor-Plasmid k9.5 wurde wiederholt in den Bait-Hefestamm *S. cerev.* EGY 48/ pSH18-34/pLexA/CARD(Apaf-1) zurücktransformiert. Nach Selektion auf UHWL⁻-X-Gal-Medium stellte sich jedesmal eine tiefblaue Färbung des Klons ein, die in vielen Fällen noch stärker ausgeprägt war als in Abb. 17 dargestellt.

Die vollständige cDNA-Sequenz von hVPS41 ist unter der Zugangsnummer U87309 in der NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>)-Gendatenbank gespeichert und umfasst einen Bereich von 4919 Basenpaaren. Ein Teil dieser Sequenz ist in Abb. 18 wiedergegeben, wobei der sequenzierte cDNA-Abschnitt von K9.5 kursiv und in Fettdruck dargestellt ist. Wie anhand der Abbildung abgeleitet werden kann, bleibt der durch das Start-ATG vorgegebene Leserahmen bis zum TAG-Stop-Codon im Bait-Vektor pYESTrp erhalten. Dadurch ist gewährleistet, dass die Transkription der im Vektor pYESTrp befindlichen Teilsequenz im Interaction Trap-System zur Expression des richtigen Proteins hVPS41 (bzw. des entsprechenden Abschnitts) führt. Das Gen *hyps41* kodiert für ein 854 Aminosäuren langes Protein (NCBI, Accession No. U87309), der gefundene Klon 9.5 umfaßt davon die letzten 176 Aminosäuren (Aminosäure 678 bis 854) (nicht gezeigt).

1	TTGCTGTCAG	GTGACTCTCC	CGTGGCGCCA	<u>TGGCGGAAGC</u>	AGTGGAGCAG	GAAACTG...
2041	AGATGATTAT	GGAGGAATTA	CATGATGTTG	ATAAAGCAAT	CGAATTTGCC	AAGGAGCAAG
2101	ATGATGGAGA	GCTGTGGGAA	GATTTGATT	TATATTCCAT	TGACAAACCA	CCATTTATTA
2161	CTGGCTTGTT	AAACAACATT	GGCACACATG	TTGACCCAAT	TCTACTGATT	CACCGTATTA
2221	AGGAAGGAAT	GGAGATCCCC	AATTTGAGAG	ATTCCTTGGT	TAAAATTCTG	CAAGACTACA
2281	ATTTGCAAAT	TCTGCTTCGT	GAAGGCTGCA	AGAAGATTCT	CGTAGCTGAC	TCTTTGTCCT
2341	TACTGAAGAA	AATGCACCGA	ACTCAAATGA	AAGGTGTTCT	TGTTGATGAG	GAGAACATCT
2401	GTGAGTCGTG	CCTTTCCCCCT	ATTCTTCCAT	CAGATGCAGC	TAAGCCCTTC	AGCGTGGTGG
2461	TCTTCCATTG	CCGGCACATG	TTCCACAAGG	AGTGCCCTGCC	CATGCCCAGC	ATGAACTCTG
2521	CTGCACAGTT	CTGCAACATC	TGCAGTGCTA	AGAACCCTGG	ACCAGGAAGT	GCAATTTTGG
2581	AGATGAAAAA	ATAGCTCATT	TCTCCTTGTC	AGTCTCCTTG	TCACCACTCT	TTTTGAGACT
2641	GTTTTTGCAA	CAACAAAAGC	ATTTGTTGAC	ACTCGTGCTG	TTAAGAGATT	TGTTTAT...

Abb. 18: cDNA-Teilsequenz von hVPS41.

Gezeigt ist ein Teil der vollständigen Gensequenz von K9.5 (5'→ 3'-Strang), wie sie nach der Gendatenbanksuche (NCBI, BLAST-Search) ermittelt wurde. Es handelt sich um die Gensequenz des Proteins hVPS41. Die kodierende Region mit einer Länge von 2564 Basenpaaren befindet sich zwischen einem Start (ATG)- und Stop (TAG)-Codon (unterstrichen). Der in Fettdruck und kursiver Schreibweise hervorgehobene Abschnitt stellt die im Prey-Vektor pYESTrp enthaltene (und nach der Sequenzierung ermittelte) cDNA-Sequenz des Interaktors K9.5 dar. Das ATG-Start-Codon ist in dieser Sequenz nicht enthalten. Es befindet sich (bei Betrachtung der vollständigen cDNA-Sequenz) 2029 Basenpaare in 5'-Richtung vor dem ersten Codon des sequenzierten Bereichs.

Aus den zwei durchgeführten Screens wurden insgesamt 7 Interaktor-Plasmide aus blauen Kolonien (Gesamtzahl blauer Kolonien: 46) isoliert und in den Bait-Hefestamm zurücktransformiert. Eines der 7 Interaktor-Proteine führte im Bait-Hefestamm zu einer Blaufärbung des Klons Nr. 9 (s. o. und Übersicht in Tab. 2).

Um zu überprüfen, ob die Interaktion von hVPS41 mit der CARD-Domäne von Apaf-1 spezifisch für das Apaf-1-Protein war, wurde untersucht, ob hVPS41 mit den CARD-Domänen weiterer Proteine interagieren konnte. Hierzu wurden die CARD-Domänen von Caspase-2- und -9 jeweils In-Frame in den „Bait“-Vektor plexA202 subkloniert und zusammen mit dem „Prey“-Plasmid pYESTrp/hVPS41 (das aus den CARD-Screens isolierte, spezifische Interaktor-Plasmid k9.5) in *S. cerevisiae* EGY 48 eingeführt. Nach dem Ausplattieren der transformierten Hefezellen auf dem Selektivmedium UHWL⁻-X-Gal und mehrtägiger Inkubation bei 30°C kam es nicht zur Ausbildung von Hefekolonien (nicht gezeigt). Dies ließ darauf schließen, dass die Reportergene *LEU2* und *LacZ* nicht aktiviert worden waren und dass es nicht zu Interaktionen zwischen hVPS41 und den CARD-Domänen von Caspase-2 und Caspase-9 gekommen war. Daraus kann geschlossen werden, dass hVPS41 mit hoher Wahrscheinlichkeit nur mit der CARD-Domäne von Apaf-1 interagiert, nicht jedoch mit den CARD-Domänen anderer Proteine wie beispielsweise Caspasen.

Um Interaktionspartner der WD-40-Domäne von Apaf-1 zu finden, wurden ebenfalls zwei Interaction Trap-Screens, WD-40₁ und WD-40₂, durchgeführt. Aus diesen Screens wurden insgesamt fünf potentielle Interaktor-Plasmide isoliert und auf ihre spezifische Interaktion geprüft. Keines dieser rücktransformierten Interaktor-Plasmide führte in dem Hefestamm *S. cerev.* EGY 48/pSH18-34/pLexA/WD-40(Apaf-1) zur Aktivierung der *LEU2*- und *LacZ*-Reportergene (nicht gezeigt). Somit konnte kein spezifischer Interaktionspartner der WD-40-Domäne gefunden werden.

2. 1. 4 Übersicht der durchgeführten Ac-P35- und Apaf-1-Interaction Trap-Screens

In der folgenden Tabelle ist eine Übersicht aller Interaction-Trap-Screens gegeben, die durchgeführt wurden, um nach Interaktionspartnern von Ac-P35 und Apaf-1 zu suchen.

Tab. 2: Übersicht der Ac-P35- und Apaf-1-Interaction Trap-Screens.

Gezeigt ist eine Übersicht der durchgeführten Interaction Trap-Screens einschließlich der ermittelten Interaktionspartner bei der Suche nach Interaktionspartnern von Ac-P35 und Apaf-1.

	Bait-Plasmide in <i>S. cerevisiae</i> EGY 48		
	pLexA/p35	pLexA/CARD (Apaf-1)	pLexA/WD-40 (Apaf-1)
Anzahl der durchgeführten Genbank-Transformationen	5 (4 x Human Placenta, 1 x Jurkat)	1 (Human Placenta)	1 (Jurkat)
Anzahl der Reporter-Screens ⁵	8 (Screens 1 _{5,3} -5 _{12,1})	2 (CARD ₁ und CARD ₂)	2 (WD-40 ₁ und WD-40 ₂)
Gesamtzahl LacZ-positiver Klone	268	46	40
Anzahl der aus LacZ-positiven Klonen isolierten, in DH5- α amplifizierten und in den Bait-Hefestamm rücktransformierten Interaktor-Plasmiden	18	7	5
Anzahl der spezifischen Interaktoren (Blaufärbung nach Rücktransformation)	9	1	Keine Blaufärbung nach Rücktransformation
Anzahl an sequenzierten, spezifischen Interaktoren	7	1	n. d.
Durch BLAST-Search (nach Sequenzierung) oder PCR (ohne Sequenzierung) ermittelte Identität der spezifischen Interaktoren	<i>hRPB11</i> (BLAST-Search: K95.1, K14.9, K1.4, K41.1, K87.6, K155.1, K64.4; PCR: K96.11, K194.11)	<i>hVPS 41</i> (K9.5)	n. d.

n. d. = nicht durchgeführt

⁵ Nach jeder Genbank-Transformation wurden alle transformierten Hefeklonen vom Nährmedium gespült, gewaschen und in 1 ml-Aliquots eingefroren. Von diesen wurden dann bestimmte Mengen (z. B. 50 μ l) entnommen und für die Reporter-Screens eingesetzt. Somit war es möglich, nach nur einer Genbank-Transformation mehrere Reporter-Screens durchzuführen.

2.2 Ko-Lokalisierung von Ac-P35 und hRPB11 in humanen Zellen

Die festgestellte Interaktion zwischen Ac-P35 und hRPB11 im Interaction Trap-System (s. o.) warf die Frage auf, ob eine solche Interaktion auch in humanen Zellen stattfinden könnte. Ein zu klärender Punkt ergab sich aus der berichteten Tatsache, daß hRPB11 ein nukleäres Protein ist, Ac-P35 jedoch zumindest überwiegend zytosolisch vorliegt, so dass es wichtig war zu untersuchen, ob Ac-P35 nach Transfektion in Zellen ebenfalls in die Zellkerne wanderte, wo es mit hRPB11 interagieren und die Transkription beeinflussen konnte. Die Interaktion ist hier nicht direkt nachprüfbar, jedoch bietet die experimentelle Bestimmung der Lokalisation von transfiziertem Ac-P35- und hRPB11-Protein in Zellen die Möglichkeit, die Wahrscheinlichkeit einer intrazellulären Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen in ihrer nativen Form abzuschätzen.

Um die intrazelluläre Lokalisation von Ac-P35 und hRPB11 in menschlichen Zellen zu bestimmen, wurden ihre Gensequenzen in Expressionsvektoren subkloniert und diese in HeLa-Zellen ko-transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen geerntet, fixiert und für die konfokale Mikroskopie vorbereitet (siehe Abschnitt 4. 2. 2. 2). Die Gensequenz von hRPB11 war zuvor mit der DNA-Sequenz von GFP (Green Fluorescent Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*) fusioniert worden, so dass das hRPB11-Protein aufgrund einer grünen Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Marc Vigneron, Louis Pasteur Universität, Illkirch, Frankreich). Die Lokalisation von Ac-P35 konnte (nach Inkubation mit einem anti-FLAG Antikörper [Sigma, Deisenhofen] sowie anschließend mit einem Antikörper, der mit einem fluoreszierenden Marker [Cy3TM, Jackson Immunoresearch Laboratories, USA] gekoppelt war) anhand einer roten Fluoreszenz bestimmt werden. Mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Zeiss, Jena) wurde die intrazelluläre Lokalisation von Ac-P35 und hRPB11 bestimmt. In Abb. 19 ist die intrazelluläre Lokalisation von Ac-P35 und hRPB11 in zwei HeLa-Zellen gezeigt. Es konnte festgestellt werden, dass Ac-P35 überwiegend im Zytosol, jedoch auch deutlich im Zellkern lokalisierte (Bild A), während hRPB11 gleichmäßiger zwischen beiden Kompartimenten verteilt war (Bild B). Wurden die Fluoreszenzen beider Proteine übereinandergelegt, so war die Ko-Lokalisation von Ac-P35 und hRPB11 deutlich zu erkennen (gelbe Bereiche, Bild D).

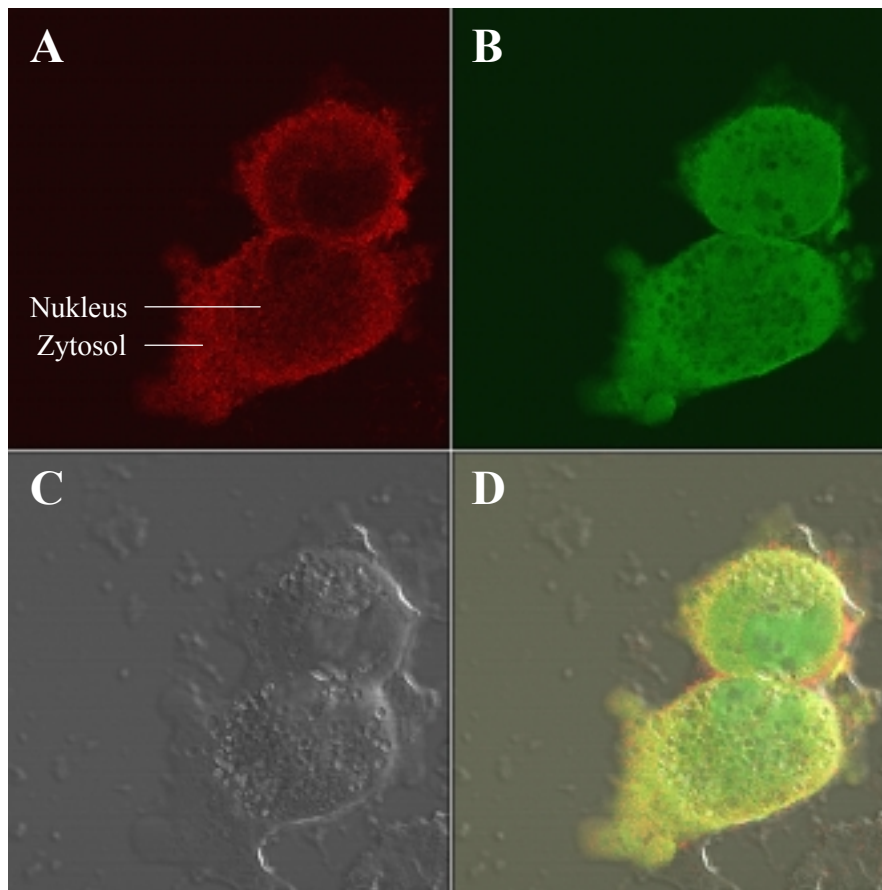


Abb. 19: Intrazelluläre Lokalisation von Ac-P35 und hRPB11.

Gezeigt ist die intrazelluläre Lokalisation des Ac-P35- und hRPB11-Proteins in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten pEF/p35FLAG und pCMV/hRPB11-GFP ko-transfiziert, die für Ac-P35FLAG und hRPB11-GFP kodierten. Zur Ermittlung der Ac-P35- und hRPB11-Lokalisation wurden die Zellen nach Transfektion fixiert und durch konfokale Laser Scanning-Mikroskopie analysiert. Für die Bestimmung der Ac-P35-Lokalisation wurden die pEF/p35FLAG-transfizierten Zellen nach dem Fixieren mit einem anti-FLAG Antikörper (Sigma), gefolgt von anti-Maus Immunglobulin-Cy3 (Jackson ImmunoResearch) inkubiert.

In den Teilbildern A-D sind zwei Zellen gezeigt, die das Ac-P35- und hRPB11-Protein enthalten. Es handelt sich in allen vier Fällen um dieselben Zellen, wobei entweder die Cy3-Fluoreszenz- (A) oder die GFP-Fluoreszenz (B) dargestellt wurde. In D wurde das Fluoreszenzlicht von Cy3 und GFP gleichzeitig aufgenommen; die Überlagerung ist in gelb zu sehen. In Bild C sind die zwei Zellen im weißen Auflicht zu sehen.

A: Das Ac-P35-Expressionsmuster (rot) weist auf eine zytosolische und nukleäre Lokalisation hin.

B: hRPB11 (grün) zeigt ein zytosolisches und nukleäres Expressionsmuster.

D: Durch Überlagerung der Cy3- und GFP-Fluoreszenzen entsteht ein gelbes Expressionsmuster, welches die Ko-Lokalisation von Ac-P35 und hRPB11 zeigt.

Das beobachtete Expressionsmuster von Ac-P35 ist repräsentativ für etwa 20-30 % der untersuchten Zellen. Das Expressionsmuster von hRPB11 wurde in allen untersuchten Zellen beobachtet.

2.3 Ac-P35 und hRPB11 haben einen Einfluss auf die Aktivität humaner Promotoren

Nachdem die spezifische Interaktion zwischen Ac-P35 und hRPB11 gezeigt worden war, war das nächste Ziel, die physiologische Bedeutung dieser Interaktion zu analysieren.

Die Interaktion von Ac-P35 mit einer RNA-Polymerase II-Untereinheit im Interaction Trap-System (s. o.) ließ vermuten, dass Ac-P35 am Vorgang der Transkription beteiligt sein könnte. Mit Hilfe des Luciferase-Assays (siehe Abschnitt 4. 2. 2. 3) wurde die Fähigkeit von Ac-P35 und hRPB11 untersucht, die Aktivität verschiedener humaner Promotoren zu regulieren.

Reporterkonstrukte wurden eingesetzt, die die Untersuchung der Aktivität verschiedener Promotoren zulassen, und der Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität wurde in den menschlichen Zelllinien LoVo, 293T und Jurkat untersucht. Exemplarisch sind hier die Ergebnisse der Untersuchungen an LoVo-Zellen gezeigt; die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Sowohl Ac-P35 als auch hRPB11 waren in der Lage, in LoVo-Zellen die Aktivität des humanen E-Cadherin-Promoters um das ca. zweifache zu erhöhen (Abb. 20, Diagramm A). Wurden die Expressionsvektoren pEF/p35 und pEF-SEM/ hRPB11, die für Ac-P35 und hRPB11 kodierten, zusammen mit dem E-Cadherin-Reporterkonstrukt E-Cad-Luc in LoVo-Zellen transfiziert, so erhöhte sich die Aktivität des E-Cadherin-Promoters bis um das Vierfache (nicht gezeigt). Untersuchungen mit einem β -Actin-Reporterkonstrukt zeigten, dass Ac-P35 die Aktivität des humanen β -Actin-Promoters in LoVo-Zellen ebenfalls steigern konnte (Abb. 20, Diagramm B). In den Zelllinien 293-T und Jurkat hingegen konnte die Aktivität des E-Cadherin- und des β -Actin-Promoters sowie die Aktivität aller übrigen getesteten Promotoren nicht durch Ac-P35 oder hRPB11 reguliert werden (Tabelle 3).

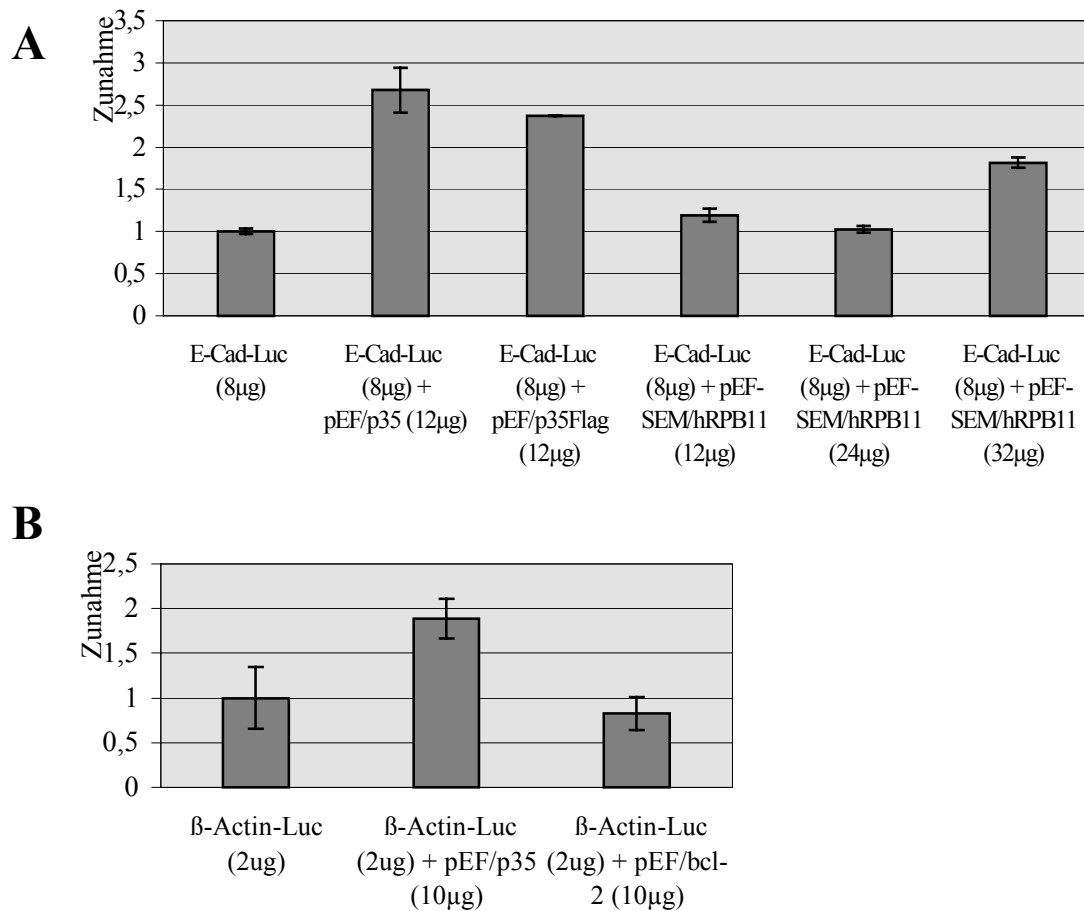


Abb. 20: Ac-P35 und hRPB11 regulieren die Promotoraktivität in LoVo-Zellen.

A: Ac-P35 und hRPB11 stimulieren die E-Cadherin-Promoteraktivität.

Zellen der humanen karzinogenen Darmzelllinie LoVo wurden mit dem E-Cadherin-Reporterkonstrukt E-Cad-Luc sowie dem Expressionsvektor pEF/p35 (für Ac-P35 kodierend) oder pEF/p35FLAG (für das Fusionsprotein P35/FLAG kodierend) oder dem Expressionsvektor pEF-SEM/hRPB11 (für hRPB11 kodierend) jeweils ko-transfiziert, und die Luciferaseaktivität der Zelllysate im Luminometer wurde als relative Lichteinheiten (RLU) gemessen. Um die Basalaktivität des E-Cadherin-Promoters zu messen, wurde das Reporterkonstrukt E-Cad-Luc alleine in die Zellen transfiziert und dessen Promoteraktivität bestimmt (linke Säule).

B: Ac-P35 steigert die β-Actin-Promoteraktivität.

Zellen der Zelllinie LoVo wurden mit dem β-Actin-Reporterkonstrukt β-Actin-Luc sowie dem Expressionsvektor pEF/p35 oder dem Expressionsvektor pEF/bcl-2 (für das humane Bcl-2-Protein kodierend) jeweils ko-transfiziert, und die Luciferaseaktivität der Zelllysate wurde wie in (A) gemessen. Um die Basalaktivität des β-Actin-Promoters zu messen, wurde das Reporterkonstrukt β-Actin-Luc alleine in die Zellen transfiziert und dessen Promoteraktivität bestimmt (linke Säule).

In diesem Experiment wurde das Plasmid pEF/bcl-2, das für das Antiapoptoseprotein Bcl-2 kodierte eingesetzt, um auszuschließen, dass die promoteraktivierende Eigenschaft des Ac-P35-Proteins auf seine Eigenschaft als Apoptoseinhibitor beruhte. Wie in dem Diagramm zu sehen ist, führt die Expression des Bcl-2-Proteins kaum zu einer Veränderung der Basalaktivität des E-Cadherin-Promoters.

Alle Messwerte sind als Vielfaches des auf 1 normierten basalen E-Cadherin- bzw. β -Actin-Luciferase-wertes angegeben. Pro Transfektion wurde die Promoteraktivität zweimal (in A) bzw. dreimal (in B) gemessen; Standardabweichungen wurden aus den jeweilig gemessenen Werten errechnet, die zuvor auf den Mittelwert der E-Cadherin Basalaktivität bezogen worden waren.

Die Eigenschaft von Ac-P35 und hRPB11, den E-Cadherin-Promoter in LoVo-Zellen zu stimulieren, wurde in 7 (Ac-P35) und 3 (hRPB11) Experimenten gemessen. In allen Experimenten wurde die Promoteraktivität um das ca. Zweifache durch die beiden Proteine erhöht.

Die Fähigkeit von Ac-P35, die β -Actin-Promoteraktivität in LoVo-Zellen zu erhöhen, wurde in beiden durchgeführten Experimenten beobachtet (um das ~Zweifache in dem einen Experiment [siehe Diagramm B], um das ~1,5fache im anderen (nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment wurde beobachtet, dass hRPB11 die β -Actin-Promoteraktivität um das Zweifache in LoVo-Zellen erhöhen konnte (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

In Tabelle 3 ist eine Übersicht der durchgeführten Promotorstudien gegeben. Insgesamt wurde die Aktivität von 11 Promoterkonstrukten in Zellen der Zelllinien LoVo, 293-T und Jurkat untersucht. Eine Reihe von Vorexperimenten, in denen deutlich geringere Mengen an DNA zur Transfektion eingesetzt wurde und in denen kein Einfluss auf die Promotoraktivität gemessen wurde, sind hier nicht gezeigt.

2.4 Homologien in der Primärsequenz von Ac-P35 und hRPB3

Innerhalb des Proteinkomplexes der RNA-Polymerase II interagiert hRPB11 wahrscheinlich mit hRPB3; eine Interaktion zwischen hRPB11 und hRPB3 wurde mit verschiedenen Methoden nachgewiesen (gezeigt in Acker et al., *J Biol Chem* 1997, Fanciulli et al., *FEBS Letters* 1998).

Die cDNA-Sequenz von hRPB3 besitzt eine kodierende Region von 827 Basenpaaren Länge (NCBI, Accession No. AJ224143 und AJ224144), die Molekülmasse des Proteins beträgt 33 Kilodalton (Pati and Weissman, *J Biol Chem* 1990). Da also sowohl hRPB3 als auch Ac-P35 mit hRPB11 interagieren können, besteht die Möglichkeit, dass beide Proteine strukturelle Ähnlichkeiten besitzen. Um zu bestimmen, ob Ac-P35 als Interaktionspartner von hRPB11 eine strukturelle Ähnlichkeit oder Homologie mit dem hRPB3-Protein besitzt, wurden die primären Aminosäuresequenzen von Ac-P35 und hRPB3 miteinander verglichen. Gleichzeitig wurden die Aminosäuresequenz des Ac-P35-homologen Proteins aus dem Baculovirusstamm *Bombyx mori* NPV sowie weitere hRPB3-Homologe aus verschiedenen Organismen in die Untersuchung miteinbezogen. Die vergleichende Untersuchung der Aminosäuresequenzen wurde am Computer

mit Hilfe der Alignment-Programme Clustal und MACAW durchgeführt. Es zeigte sich, dass besonders in zwei Sequenzabschnitten deutliche Anhäufungen von identischen und ähnlichen Aminosäuren auftraten. Diese beiden Bereiche sind in Abb. 21 dargestellt.

Tab. 3: Übersicht der durchgeführten Promotorstudien.

Gezeigt sind die verschiedenen Reporterkonstrukte, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Es sind im weiteren die Anzahl der Experimente angegeben, in denen eine Regulierung (\uparrow =Stimulierung) oder keine Regulierung (–) der Promotoraktivität (bei den jeweils angegebenen Mengen an transfiziertem Reporter- und Expressionsplasmid) erfolgte. Das Ausmaß der Stimulierung eines Promotors durch Ac-P35 bzw. hRPB11 ist als Vielfaches des Basalwertes des betrachteten Promotors angegeben.

Reporter	Transfizierte Plasmide	Anzahl der Experimente (LoVo)	Promotoraktivität (LoVo)	Zunahme der Promotoraktivität (LoVo)	Anzahl der Experimente (293T)	Promotoraktivität (293-T)
E-Cad-Luc (6-8 μ g)	pEF/p35 (12-18 μ g)	7	\uparrow	1,5-2,5 x	1	–
	pEF-SEM/hRPB11 (18-32 μ g)	3	\uparrow	2 x		n. g.
	pEF/p35 (12 μ g) + pEF-SEM/hRPB11 (32, 40 μ g)	2	\uparrow	2-4 x		n. g.
β -Actin-Luc (2 μ g)	pEF/p35 (8, 10 μ g)	2	\uparrow	1,5-2,5 x		n. g.
	pEF-SEM/hRPB11 (8 μ g)	1	\uparrow	2 x		n. g.
CMV-Luc (0,5-1 μ g)	pEF/p35 (1-9,5 μ g)		n. g.		2	–
	pEF-SEM/hRPB11 (9,5 μ g)		n. g.			–
Hsp-70-Luc (0,25 μ g)	pEF/p35 (9,75 μ g)		n. g.		1	–
	pEF-SEM/hRPB11 (9,75 μ g)					–
MHC-I-Luc (0,25 μ g)	pEF/p35 (9,75 μ g)		n. g.		1	–
	pEF-SEM/hRPB11 (9,75 μ g)					–
WNT-Luc (0,25 μ g)	pEF/p35 (9,75 μ g)		n. g.		1	–
	pEF-SEM/hRPB11 (9,75 μ g)					–
IL-8-Luc (0,5 μ g)	pEF/p35 (9,5 μ g)		n. g.		2	–
IL-2-Luc (0,5 μ g)	pEF/p35 (9,5 μ g)		n. g.		1	–
AP-1-Luc (0,5 μ g)	pEF/p35 (9,5 μ g)		n. g.		2	–
ELAM-Luc (0,5 μ g)	pEF/p35 (9,5 μ g)		n. g.		1	–
IgH-Luc (0,5 μ g)	pEF/p35 (9,5 μ g)		n. g.		1	–

n. g. = nicht getestet

AcP35	1	M C V I F P V E I D V S Q T V I I R D C Q V D K Q T R E L V Y I	31
BmP35	1	M C V I F P V E I D V S Q T V I I R D C H V D E Q T R E L V Y I	31
SpRPB3		1 M D - S E T H I T I R N I S K N S V D F V L T	22
ScRPB3		1 M S E E G P Q V K I R E A S K D N V D F I L S	23
CeRPB3	1	M P Y A N Q P N I E V T E L T N D I I K - - - - F V L W	24
hRPB3	1	M P Y A N Q P N V R I T E L T D E N V K - - - - F I I E	24
AcP35	32	N K I M N T Q L T - K P V L M M F N I S G P I R S V T R K N N	61
BmP35	32	N K I M N T Q L T - K P V L M M F N I S G P I R S V T R K N N	61
SpRPB3	23	N T S L A V A N S L R R V V L A E I P T V A I D L V E I N V N	53
ScRPB3	24	N V D L A M A N S L R R V M I A E I P T L A I D S V E V E T N	54
CeRPB3	25	D T D L S V A N S L R R V F M A E V P T I A I D W V Q I E T N	55
hRPB3	25	N T D L A V A N S I R R V F I A E V P I I A I D W V Q I D A N	55
AcP35	62	N L R D R I K S K V D E Q F D Q L E R D Y S D Q M D G F H D S	92
BmP35	62	D L R D R I K S K V D E Q F D Q L E R E Y S D K I D G F H D N	92
SpRPB3	54	T S V M P D E F - L A H R L G M I P L D S S N I D E P P P V G	83
ScRPB3	55	T T V L A D E F - I A H R L G L I P L Q S M D I E Q L 80	
CeRPB3	56	T S V L H D E F - I A H R M G L I P F I S D Y H V E K 81	
hRPB3	56	S S V L H D E F - I A H R L G L I P L I S D D I V D K 81	
AcP35	93	I K Y F K D E H Y S V S C	105
BmP35	93	I Q Y F K D E H Y S V S C	105
SpRPB3	84	L E Y T R N C D C D Q Y C	96
ScRPB3	81	E Y S R D C F C E D H C	92
CeRPB3	82	M Q Y T R D C E C A E F C	94
hRPB3	82	L Q Y S R D C T C E E F C	94
AcP35	153	C V L K P G F E N G S N Q - - - - V L S F E Y N T I G N K V	178
BmP35	153	C V L K P G F E N G S N Q - - - - V L S F E Y L P I G N K V	178
CeRPB3	169	A Y V K K G F G K E H A K W N P T C G V A F E Y D P D N A L R	199
hRPB3	163	A Y A K K G F G K E H A K W N P T A G H C F E Y D P D N S N R	193
DmRPB3	164	A Y A K K G F G K E H A K W N P T A G V A F E Y D P D N A L R	194
ScRPB3	157	C V A K K G T A K E H A K G G P A A A I E F E Y D P W N K L K	187
SpRPB3	158	C I A K K G I A K E H A K W S P T S A V A F E Y D P W N K L Q	188
AcP35	179	I V P F A H E I N D T G L Y E Y D V V A Y V D S V Q F D G E Q	209
BmP35	179	I V P F A H E I N D T G L Y E Y D V L A Y V D S V E F D G K Q	209
CeRPB3	200	H T I Y P N V E - - - E W P R S D H S S L P E D S T E K E A	226
hRPB3	194	H T L Y P K P D - - - E W P K S E H T E L E D D Q Y E A P Y	220
DmRPB3	195	T T V Y P K P E - - - E W P K S E Y S E L D E D E S Q A P Y	221
ScRPB3	188	H T D Y W - - - - - Y E Q D S A K E W P Q S K - - N C E	208
SpRPB3	189	H T D Y W - - - - - F E N D A D A E W P K S K - - N A D	209
AcP35	210	F E E	212
BmP35	210	F E E	212
CeRPB3	227	P F E	229
hRPB3	221	N W E	223
DmRPB3	222	D P N	224
ScRPB3	209	Y E D	211
SpRPB3	210	W E E	212

Ac = *Autographa californica* NPV, Bm = *Bombyx mori* NPV,
Ce = *Caenorhabditis elegans*, Dm = *Drosophila melanogaster*,
h = *Homo sapiens*, Sc = *Saccharomyces cerevisiae*,
Sp = *Schizosaccharomyces pombe*

Ac = *Autographa californica* NPV, Bm = *Bombyx mori* NPV,
 Ce = *Caenorhabditis elegans*, Dm = *Drosophila melanogaster*,
 h = *Homo sapiens*, Sc = *Saccharomyces cerevisiae*,
 Sp = *Schizosaccharomyces pombe*

Abb. 21: Vergleich der Aminosäuresequenzen von P35 und RPB3 aus verschiedenen Organismen.

Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hervorgehoben. Die Sequenzen werden zum Teil von Lücken unterbrochen, die bei der Optimierung des Vergleichs eingeführt wurden. Die Nummerierungen beginnen an den jeweiligen N-Termini der Proteine. Jede Aminosäure ist anhand ihres Einbuchstaben-Codes dargestellt. Als ähnlich werden hier Aminosäuren bezeichnet, die aufgrund der chemischen Beschaffenheit ihrer Seitenketten einer der folgenden Gruppen zugeordnet werden können: aliphatische (V, L, I, M), aromatische (F, Y), saure (D, E) und basische (R, K, H) Aminosäuren. Glycin (G) und Alanine (A) bilden aufgrund ihrer Größe eine eigene Gruppe. Serin (S) und Threonine (T) werden aufgrund ihrer Hydroxylgruppen, Asparagine (N) und Glutamine (Q) wegen ihrer Säureamidfunktion zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst.

3 Diskussion

3.1 Übersicht

Der Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Suche nach Interaktionspartnern des Proteins P35 aus *Autographa californica* (Ac-P35) sowie in der Charakterisierung solcher Interaktionspartner. Diese Aufgabenstellung ergab sich aus Experimenten, dessen Auswertung deutliche Hinweise auf die Existenz eines zellulären Homologs von Ac-P35, das mit viralem P35 interagiert, aufzeigten.

Das Ziel war es, das vermutete zelluläre P35-Homolog zu klonieren und funktionell und strukturell zu charakterisieren. Fernerhin wurde die Fähigkeit von Ac-P35 überprüft, Homodimere zu bilden.

Da virale Proteine in vielen Fällen mit mehreren zellulären Proteinen interagieren können (s. o.), war es zudem von großem Interesse, neben dem vermuteten zellulären Homolog weitere Interaktionspartner von Ac-P35 zu identifizieren und diese mittels geeigneter Experimente zu charakterisieren.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass Ac-P35 im Interaction Trap-System homodimerisierte. Diese Eigenschaft von Ac-P35 Homodimere zu bilden steht in engem Zusammenhang mit kürzlich publizierten Daten und mit Beobachtungen, die in den vorbereitenden Untersuchungen gemacht wurden.

Das Ziel, ein zelluläres Homolog von Ac-P35 zu finden und zu charakterisieren, konnte nicht erreicht werden. Statt dessen deuten die Versuchsergebnisse daraufhin, dass Ac-P35 an Transkriptionsvorgängen in infizierten Zellen beteiligt sein könnte. Diese bislang unbekannte Eigenschaft des viralen P35-Proteins könnte für das Auftreten von bestimmten Phänomenen verantwortlich sein, die an Ac-P35-exprimierenden Zellen bereits früher beobachtet worden sind.

Der zweite Teil der Aufgabenstellung umfasste die Suche und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Caspasenadaptormoleküls Apaf-1. Der gefundene Interaktionspartner wurde als das humane Homolog eines Proteins, das am intrazellulären Proteintransport in *Saccharomyces cerevisiae* beteiligt ist, identifiziert. Die physiologische Relevanz einer solchen Interaktion wird hier diskutiert.

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern des Ac-P35- und des Apaf-1-Proteins und zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde das Yeast Two-Hybrid-System in der Variante des sog. *Interaction Trap* eingesetzt (siehe Material und Methoden, Abschnitt 4. 2. 2. 1. 1).

Yeast Two-Hybrid-Systeme sind sehr wirkungsvolle Instrumente, um in vivo Proteine aufgrund ihrer Interaktion mit einem bekannten Protein zu identifizieren und um die Interaktion zwischen einem Proteinpaar näher zu charakterisieren (Golemis et al., *Curr. iss. Mol. Biol.* 1999, Young, *Biol Reprod* 1998; Luban and Goff, *Curr Opin Biotechn* 1995). Beispielsweise konnten mehrere intrazelluläre Interaktionspartner des antiapoptotischen Adenovirusproteins E1B 19K gefunden (Farrow et al., *Nature* 1995) und die Oligomerisierung des TNF Rezeptors 1 sowie seine Interaktion mit dem Adaptormolekül TRADD entdeckt werden (Song et al., *J Biol Chem* 1994; Hsu et al., *Cell* 1995). Mit der Two-Hybrid-Methode gelang es im Weiteren, Homodimerisierungen viraler Proteine zu untersuchen (Kalpana and Goff, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993) und Domänen zu identifizieren, die an der Oligomerisierung von Proteinen wie z. B. des Tumorsuppressorproteins P53, beteiligt sind (Iwabuchi et al., *Oncogene* 1993).

3. 2 Dimerisierung des P35-Proteins

3. 2. 1 Homodimerisierung von Ac-P35

Aufgrund der vermuteten Dimerisierung des postulierten zellulären P35-Proteins und die im Western-Blot auftretenden höhermolekularen Ac-P35-Banden nach Überexpression von Ac-P35 in menschlichen Zellen (siehe Problemstellung) wurde davon ausgegangen, dass Ac-P35 mit hoher Wahrscheinlichkeit mit sich selbst Dimere bilden kann.

Um die Bildung von Homodimeren bei Ac-P35 zu untersuchen und zu charakterisieren, wurden LexA-bzw. B42-Fusionsplasmide generiert, die Ac-P35 als vollständiges Protein oder als N- und C-terminale Deletionsmutante enthielten. Die Plasmide wurden paarweise und in unterschiedlichen Kombinationen in Hefezellen eingeführt und durch Selektion auf Selektivmedien wurde überprüft, ob die exprimierten Fusionsproteine in den Hefezellkernen miteinander interagierten.

Mit Hilfe des Interaction Trap-Systems konnte gezeigt werden, dass das vollständige Ac-P35-Protein Homodimere bilden kann (siehe Ergebnisse, Abb. 12).

In einem von mehreren Experimenten, die im Rahmen der Vorarbeiten durchgeführt worden sind, wurden Vertebratenzellen mit einem Ac-P35 Expressionsplasmid transfiziert. Im Western-Blot, das mit den Lysaten dieser Zellen durchgeführt wurde, traten höher molekulare, Ac-P35-spezifische Spezies auf (siehe Problemstellung, Abb. 3), die nun vor dem Hintergrund der beobachteten Homodimerisierung von Ac-P35 im Interaction Trap-System wahrscheinlich als Folge der Dimerisierung von je zwei Ac-P35-Molekülen aufzufassen sind.

Hinweise auf die Fähigkeit von Ac-P35 zu homodimerisieren finden sich des Weiteren in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit: *Fisher et al.* berichten über Kristallstrukturanalysen an gereinigtem Ac-P35-Protein. Anhand ihrer Daten vermuten sie, dass Ac-P35 in Lösung Homodimere bildet (Fisher et al., *EMBO* 1999). Hinweise auf eine Homodimerisierung von Ac-P35 finden sich auch in den Arbeiten von *Zoog et al.*, wo mittels des Yeast Two-Hybrid-Systems die Interaktion von zwei vollständigen Ac-P35-Monomeren (Aminosäuren 1- 299) nachgewiesen werden konnte. Ausgehend von Zelllysaten, die aus Insektenzellen gewonnen wurden, welche zuvor mit rekombinanten Baculoviren infiziert worden waren und das Ac-P35-Protein synthetisierten, wurden außerdem Ni^{2+} -Aufreinigungs- und Cross-Linking-Experimente durchgeführt. Im Anschluss an diese Experimente wurden Immuno-Blot-Analysen durchgeführt und es konnten Ac-P35-spezifische Banden nachgewiesen werden, die auf eine Di- und Multimerisierung von Ac-P35 in vivo hindeuteten. Nach Auffassung der Autoren erfolgte die Bildung dieser Komplexe unter Beteiligung von hydrophoben Wechselwirkungen (Zoog et al., *Journal of Biological Chemistry* 1999).

Es stellt sich die Frage nach der biologischen Relevanz einer Di- oder Oligomerisierung von Ac-P35. *Zoog et al.* (s. o.) gehen davon aus, dass eine in vivo-Oligomerisation zu einer Erhöhung der örtlichen Konzentrationen an Ac-P35-Protein und somit zu einer Beschleunigung der Inhibierung von Caspasen an den beiden aktiven Zentren führen könnte (mittels Kristallstrukturanalysen konnte ermittelt werden, dass aktive Caspase -1 und Caspase-3 Tetramere bilden, die aus zwei Heterodimeren (zwei unterschiedlich langen Untereinheiten [p17/p12-Heterodimer in Caspase-3, p20/p10-Heterodimer in Caspase-1]) bestehen [Mittl et al., *J. Biol. Chem.* 1997; Walker et al., *Cell* 1994]; durch diese Anordnung entstehen jeweils zwei katalytische Zentren pro Caspase). Die Autoren (*Zoog et al.*) vermuten weiterhin, dass ein Ac-P35-Dimer mit den aktiven Zentren zweier Caspasen gleichzeitig in vivo interagieren kann, was

auf eine Rolle des Ac-P35-Proteins als multivalenten Proteaseinhibitor hindeutet. Die Hypothese, dass eine gleichzeitige Inhibitierbarkeit beider aktiver Zentren von Caspasen durch Ac-P35 möglich ist, wird von *Zhou et al* anhand von Experimenten mit gereinigten Caspase-3 und Ac-P35-Proteinen stark unterstützt (*Zhou et al.*, *Biochemistry* 1998).

Im Gegensatz zu den Autoren *Zoog et al.* (s. o.) wird in der vorliegenden Arbeit nicht davon ausgegangen, dass eine Di- oder Oligomerisierung von Ac-P35 zu einer Beschleunigung der Inhibierung von Caspasen führen würde; es ist nicht ohne weiteres einzusehen, welchen funktionellen Unterschied ein P35-Dimer oder -Oligomer gegenüber zwei oder mehreren einzelnen, benachbarten P35-Molekülen hinsichtlich der Effektivität der Inhibierung von Caspasen besäße. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch auch davon ausgegangen, dass die Dimerisierung von Ac-P35 eine physiologische Bedeutung hinsichtlich der Interaktion dieses Proteins mit zellulären Proteinen besitzt; vielleicht ist eine Dimerisierung des Ac-P35-Proteins sogar für die Interaktion mit zellulären Proteinen wie Caspasen oder hRPB11 notwendig.

Um sichere Aussagen machen zu können, inwieweit eine P35-Dimerisierung gegenüber monomerem P35-Protein einen Einfluss auf die Inhibition von Caspasen ausübt, müssten geeignete Experimente entworfen werden. Beispielsweise könnte man Experimente mit gereinigtem Ac-P35-Protein (die Dimerisierung des P35-Proteins könnte mittels Immuno-Blot-Verfahren überprüft werden) sowie mit P35-Mutanten, die eine Dimerisierung des Proteins nicht zulassen, durchführen: jeweils definierte Konzentrationen an P35-Protein würden in Zellen exprimiert und mit definierten Mengen gereinigter Caspase inkubiert werden. Durch Messung der Aktivität eines spezifischen Caspasensubstrates würde sich anschließend die jeweilige Caspasenaktivität messen lassen und somit könnten Aussagen über das Maß der Inhibition gemacht werden. An dieser Stelle sind publizierte Daten von *Zoog et al* (s. o.) zu nennen, die einen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit des Ac-P35-Proteins sowohl zur Dimerisierung als auch zur Caspasen-inhibition erkennen lassen: in-vitro-Assays mit zwei Ac-P35-Mutanten zeigten, dass diese Mutanten zwar effiziente Substrate der Caspase-3- darstellten, jedoch nicht in der Lage waren, Caspase-3 zu inhibieren. Im Yeast Two-Hybrid-System konnte dann festgestellt werden, dass diese Mutanten auch nicht in der Lage waren zu dimerisieren. Weiterhin waren diese und weitere Mutanten, die im Two-Hybrid-System nicht dimerisieren konnten, nicht fähig, Apoptose zu inhibieren (*Zoog et al.*, *J Biol Chem* 1999). Diese Daten lassen zunächst vermuten, dass eine Dimerisierung von Ac-P35 für die Caspasen- und Apoptoseinhibition (durch Ac-P35) von Bedeutung ist. Um jedoch gesicherte Aussagen über die inhibitorischen Eigenschaften von monomerem und di-oder oligomerem P35-Protein machen zu können, müssen mehrere Studien ähnlicher Art

durchgeführt werden; es ist unbedingt notwendig festzustellen, welche Mutationen eingeführt werden müssen, damit das Ac-P35-Monomer in seiner nativen Konformation vorliegt (wäre dies nicht der Fall, könnte z. B. das Unvermögen, Caspasen zu inhibieren, nicht auf eine intrinsische Eigenschaft des P35-Proteins zurückzuführen sein, sondern lediglich auf die durch die eingeführte Mutation veränderte Konformation des P35 Moleküls).

Im Augenblick ist es mit den Daten, die in dieser Arbeit und den dazugehörigen Vorarbeiten generiert wurden, nicht möglich, eindeutig zu entscheiden, ob Ac-P35 dimerisiert oder einen Komplex aus mehreren Molekülen bildet. Die höher molekularen Banden, die in den Immunoblots aus mehreren Ac-p35- Transfektionsexperimenten erhalten wurden (siehe Abb. 3), lassen aufgrund ihrer Größe (ca. 70 kDa) zunächst nur eine Dimerisierung erwarten (allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass auch eine tetramere Anordnung von P35-Molekülen denkbar ist und dass die im Western-Blot auftretenden 70 kDa-Banden auf einen Abbau dieser Tetramere durch die SDS- und Hitzebehandlung der Zelllysate zurückzuführen sein könnte). Im Interaction Trap-System ist eine Interaktion zwischen zwei Molekülen, die jeweils mit einer DNA-Bindungsdomäne oder einer Aktivierungsdomäne fusioniert sind, notwendig für ein positives Ergebnis, jedoch ist auch vorstellbar, dass multimere Proteinkomplexe zu einer Aktivierung der Reportergene führen können, sofern die an die jeweiligen Einzelmoleküle fusionierten Transkriptionsdomänen von dem Komplex nicht sterisch blockiert werden.

3. 2. 2 Zelluläres P35-Protein: Homodimerisierung und Interaktion mit Ac-P35?

In Experimenten, die im Rahmen der Vorarbeiten durchgeführt worden sind, konnte gezeigt werden, dass das postulierte zelluläre P35-Homolog während der Apoptose zum einen aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt wurde, zum anderen höher molekulare Komplexe bildete, die mit einem anti-Ac-P35-Antiserum detektiert werden konnten (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen wurden an Vertebratenzellen gemacht, in denen zuvor Apoptose induziert wurde. Ob diese Komplexe, die im Western-Blot der betreffenden Vertebratenzelllysaten als etwa 70 kDa-große Banden auftraten, auf einer Homodimerisierung des zellulären p35-Homologs zurückzuführen waren oder vielmehr auf einer Interaktion dieses Homologs mit anderen zellulären Molekülen basierten, konnte zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht

eindeutig geklärt werden. Eine Homodimerisierung des postulierten zellulären P35-Homologs erscheint nun vor dem Hintergrund der hier gezeigten Homodimerisierung von Ac-P35 als wahrscheinlich. Weiterhin kann angenommen werden, dass das zelluläre P35-Homolog mit Ac-P35 hetero-dimerisieren bzw. oligodimerisieren kann. Unterstützt wird letztere Hypothese auch durch den Befund, dass der N-Terminus von Ac-P35 nach Transfektion in Vertebratenzellen zum einen in den Mitochondrien lokalisiert war, also dort, wo auch das zelluläre P35-Protein lokalisiert ist.

Über die biologische Bedeutung des zellulären P35-Proteins kann im Augenblick nur spekuliert werden. Offensichtlich gehen mit diesem Protein während der Apoptose bestimmte Veränderungen vor, wobei die dimere Form möglicherweise bevorzugt wird: in den Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass nach Apoptoseinduktion durch Serumentzug in COS7-Zellen die für das zelluläre P35-Homolog typische Bande bei etwa 37 kDa im Western-Blot verschwand, dagegen Banden im Bereich von 70 kDa auftraten (nicht gezeigt). Vielleicht erfüllt zelluläres P35 eine Funktion während der Apoptose, wobei es in dimerer oder oligomerer Form als Caspasensubstrat dient. Die Spezialisierung von viralem P35 auf die Inhibition von Caspasen könnte im Zuge der Adaptation eine evolutionäre Veränderung dieser ursprünglichen Funktion darstellen. Einer von mehreren möglichen Mechanismen der Caspaseninhibition (siehe Abschnitt 1. 2. 6. 1 für eine ausführlichere Diskussion der Caspaseninhibition durch Ac-P35) durch Ac-P35 könnte z. B. der eines kompetitiven Caspaseninhibitors sein, wobei viral exprimiertes P35-Protein erfolgreich gegen zelluläres P35 um die Bindungsstellen der Proteasen konkurriert. Andererseits ist es denkbar, dass es noch weitere Funktionen von Ac-P35 innerhalb seiner Rolle als Apoptoseinhibitor gibt, von denen eines die spezifische Interaktion mit seinem zellulären Homolog während der Apoptose ist. Dadurch würden die örtlichen Konzentrationen des zellulären Homologs soweit verringert sein, dass dieses nicht mehr an Caspasen oder andere wichtige zelluläre Komponenten binden könnte. Weiterhin ist es möglich, dass eine Heterodimerisierung von viralem und zellulärem P35-Protein die native Konformation des zellulären dimeren Homologs so weit verändert, dass es nicht mehr als Substrat oder Bindungspartner erkannt werden kann.

Hier stellt sich die Frage, weshalb im Interaction Trap-System das vermutete zelluläre P35-Homolog nicht als Bindungspartner von Ac-P35 nachgewiesen werden konnte (siehe Punkt 3. 3 der Diskussion). Dazu muss gesagt werden, dass im Interaction Trap-System Ac-P35 als Fusionprotein mit LexA, die potentiellen Bindungspartner als Fusionsprodukt mit der Aktivierungsdomäne B42 vorliegen (siehe Material und Methoden, Abschnitt 4. 2. 2. 1). Nun ist

es möglich, dass das Protein LexA bzw. das Peptid B42 die Konformation der an ihnen fusionierten Proteine derart beeinflussen können, dass eine Interaktion dieser Proteine aus sterischen Gründen nicht mehr möglich ist. Außerdem ist es möglich, dass bestimmte Aminosäuren, die für Interaktionen benötigt werden, durch die Fusion des Proteins mit LexA oder B42 blockiert sind (Estojak et al., *Mol. cell. Biol.* 1995). Möglicherweise war das durch die verwendeten Genbibliotheken exprimierte zelluläre P35-Homolog durch die Fusion mit der Aktivierungsdomäne B42 in eine für die Interaktion mit Ac-P35 ungünstigen Konformation gezwungen worden. Denkbar ist auch, dass bei dem zellulären P35-Protein (nicht jedoch bei Ac-P35) die für intermolekulare Bindungen benötigten Aminosäuren durch die Fusion des Proteins mit B42 blockiert waren.

Eine definierte Aussage über die Fähigkeit des zellulären P35-Homologs zu homodimerisieren bzw. mit Ac-P35 höher molekulare Komplexe einzugehen ist jedoch nur dann eindeutig möglich, wenn das zelluläre Protein kloniert und im Experiment, z. B. durch Interaction Trap-Studien und Ko-Immunpräzipitationen auf diese Funktionen hin untersucht worden ist (etwa zur gleichen Zeit, als diese Arbeit durchgeführt worden ist, wurden im Rahmen einer Doktorarbeit in unserem Labor Versuche unternommen, das zelluläre P35-Protein anzureinigen. Die Anreinigung erfolgte aus der mitochondrialen Fraktion von Jurkat-Zellen unter Einsatz der Anionenaustauschchromatographie und der präoperativen SDS-PAGE. Nach einem Konzentrierungsschritt wurde das angereinigte Material zur Ermittlung der Proteinsequenz mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht. Es wurden leider nur sehr kurze Peptidsequenzen erhalten, was eine eindeutige Identifizierung anhand von Datenbanksuchen nicht möglich machte. Nach Aneinanderreihung einiger solcher Peptidsequenzen konnte eine gewisse Ähnlichkeit mit einem Protein unbekannter Funktion aus *Drosophila melanogaster* hergeleitet werden, jedoch konnten Homologien zu Proteinen aus weiteren Organismen oder des Menschen nicht gefunden werden).

3. 2. 3 Die Rolle der N- und C-terminalen Anteile bei der Dimerisierung von Ac-P35

Ein interessanter Aspekt bei den Untersuchungen an Ac-P35 mit dem Interaction Trap-System war der Befund, dass beide Deletionsmutanten von Ac-P35, die jeweils nur den N- oder C-terminalen Teil des Proteins umfassten (N-P35 oder C-P35), mit dem Gesamtprotein interagierten. Anhand der Intensität der Blaufärbung auf X-Gal-haltigem Selektivmedium wurde die Interaktion von N-P35 mit dem vollständigen Protein als sehr stark bewertet. Die Interaktion von C-P35 mit dem vollständigen P35-Protein wurde im Vergleich dazu als relativ schwach beurteilt, jedoch war eine deutliche Blaufärbung des Klons auf dem Selektivmedium erkennbar, so dass trotz der geringeren Intensität der Blaufärbung eine Interaktion stattgefunden haben muss. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Teil von Ac-P35 mit der C-terminalen Hälfte von Ac-P35, nicht jedoch mit sich selbst, interagiert; die Interaktion von N-P35 mit C-P35 scheint dabei geringfügig schwächer zu sein als zwischen C-P35 und volle-Länge Ac-P35, wie anhand der Blaufärbung des Klons auf X-Gal-haltigem Selektivmedium zu erkennen war. In Tab. 4 ist, soweit mit dem Interaction Trap-System festgestellt werden konnte, die Interaktion von Ac-P35 mit sich selbst, die Interaktion zwischen Ac-P35 und den Ac-P35-Deletionsmutanten sowie die Interaktionen zwischen den einzelnen Ac-P35-Deletionsmutanten dargestellt:

Tab. 4: Interaktionen der Ac-P35-Anteile.

	Ac-P35	N-P35	C-P35
Ac-P35	+++	+++	++
N-P35	+++	–	+
C-P35	++	+	n. g.

+++ : starke Interaktion
 ++ : Interaktion rel. schwach, aber deutlich sichtbar
 + : Interaktion schwach ausgeprägt
 – : keine Interaktion
 n. g. : nicht getestet

Da eine Bindung zwischen den N-terminalen Enden von Ac-P35 im Interaction Trap-System nicht stattfindet, erfolgt die Interaktion zwischen zwei P35-Molekülen höchstwahrscheinlich durch die Interaktion zwischen dem N-Terminus des einen Moleküls mit dem C-Terminus des anderen. Diese Dimerisierung des Ac-P35-Proteins ist in Abb. 22 schematisch dargestellt. In der

Abb. 22 sind ebenfalls die N- und C-terminalen Deletionsmutanten von Ac-P35 veranschaulicht, die in den hier diskutierten Interaction Trap-Experimenten eingesetzt wurden.

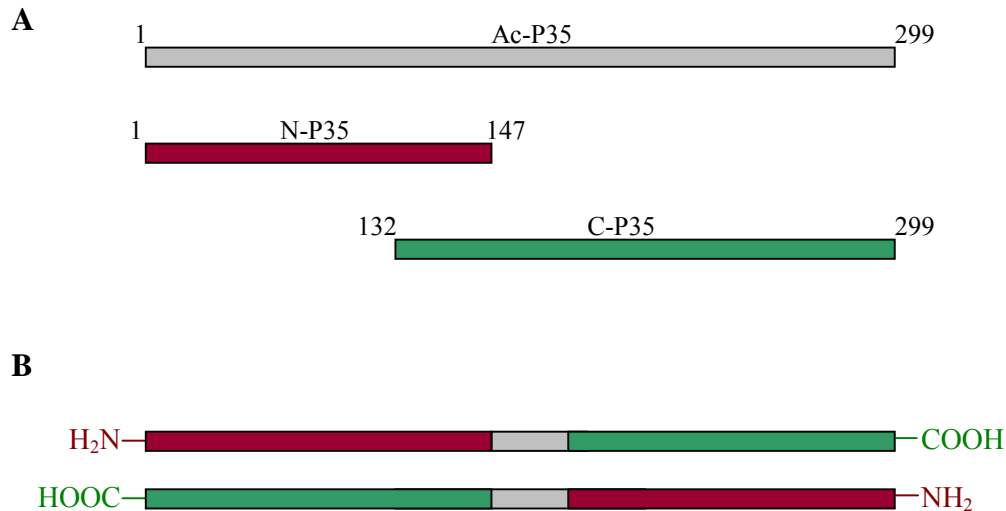


Abb. 22: Dimerisierung von Ac-P35.

A: Schematische Darstellung des vollständigen Ac-P35-Proteins (Monomer, AS 1-299) sowie der Deletionsmutanten von Ac-P35 (N-P35: N-Terminus, C-P35: C-Terminus), die für Interaction Trap-Studien (siehe Abschnitt 2. 1. 2) verwendet wurden. Für diese Studien wurden die DNA-Sequenzen der gezeigten Proteine in die Interaction Trap-Vektoren pLexA202 und pJG4-5 subkloniert. Die Längen der Moleküle sind durch die Anzahl der Aminosäuren in den Proteinen wiedergegeben.

B: Schematische, hypothetische Darstellung der Homodimerisierung von Ac-P35, abgeleitet aus Daten, die mittels Interaction Trap-System und unter Verwendung der in A dargestellten Proteine gewonnen wurden: jeweils zwei Ac-P35-Moleküle bilden ein Dimer, wobei der N-Terminus des einen Moleküls mit dem C-terminalen Ende des anderen Monomers interagiert.

Über die Ursachen, die den Unterschieden in der Stärke der Interaktionen zugrunde liegen, kann nur spekuliert werden: die relativ schwache Interaktion zwischen N-P35 und C-P35 hängt vermutlich damit zusammen, dass Ac-P35 hier nicht als ganzes Protein vorliegt. Anders als im vollständigen Protein ist die Möglichkeit, in mindestens zwei Bereichen eines Monomers Bindungen einzugehen (am N- und C-Terminus), nicht gegeben; eine Bindung ist nur einmal möglich. Im vollständigen Molekül kann am entgegengesetzten Ende des Moleküls eine zweite Interaktion stattfinden, was das Dimer stabilisieren könnte. Fraglich ist auch, ob die beiden Deletionsmutanten in einer günstigen sterischen Anordnung zueinander kommen können, wie dies im Dimer des volle-Länge Proteins wahrscheinlich der Fall wäre. Schließlich besteht die Möglichkeit, dass die beiden Deletionsmutanten unter dem sterischen Einfluss der mit ihnen fusionierten Domänen LexA und B42 stehen und deshalb miteinander schwächere Interaktionen

eingehen, da bestimmte Aminosäuren, die für die intermolekularen Bindungen verantwortlich sind, sterisch blockiert werden.

Die Beobachtung, dass C-P35 mit dem Gesamtprotein nur relativ schwach interagierte, liegt möglicherweise an der sterischen Behinderung bestimmter Aminosäuren durch das am N-Terminus von Ac-P35 fusionierte B42-Peptid: die Bindung von C-P35 an den N-Terminus von Ac-P35 wäre also zum einen schwächer als bei einer Interaktion mit Ac-P35 ohne B42-Fusion, zum anderen fehlt bei C-P35 der N-terminale Teil von Ac-P35, der durch Bindung an bestimmte Aminosäuren im C-Terminus von Ac-P35 die Interaktion wieder stabilisieren würde. Die reversible Reaktion bei der Interaktion von C-P35 mit Ac-P35, also die Dissoziation des Komplexes in die Einzelmoleküle, wäre somit begünstigt und als Folge würde sich die Anzahl der zu einer Aktivierung der Reportergene zur Verfügung stehenden Ac-P35/C-P35-Fusionsprotein-Komplexe verringern.

Die weiter oben erwähnte starke Interaktion von N-P35 mit dem vollständigen Protein lässt sich dadurch erklären, dass der C-terminale Teil von Ac-P35 möglicherweise weniger stark unter dem sterischen Einfluss des N-terminal fusionierten B42-Proteins steht. Folglich können mehr Aminosäuren für intermolekulare Bindungen mit N-P35 zur Verfügung stehen. Obwohl bestimmte Aminosäuren in N-P35, die für intermolekulare Bindungen verantwortlich sind, vermutlich von LexA sterisch blockiert werden, können möglicherweise andere, benachbarte Reste Bindungen mit entsprechenden, „frei gewordenen“ Aminosäurefunktionen des C-Terminus' von Ac-P35 eingehen.

Im Zusammenhang mit dem bisher Gesagten stehen Beobachtungen, die auf eine besondere Rolle des N-terminalen Teils von Ac-P35 hinweisen: Insektenzellen, die die Ac-P35-Deletionsmutante P35¹⁻⁷⁶ (Aminosäuren 1-76) exprimierten, gingen nach Infektion mit dem Wild-Typ-AcMNPV-Virus, das für das vollständige P35-Protein codierte, in die Apoptose über. In Kontrollzellen, die Ac-P35, nicht jedoch P35¹⁻⁷⁶ enthielten, trat hingegen keine Apoptose auf. Auch in kontroll-transfizierten P35¹⁻⁷⁶-Zellen konnte keine Apoptose nachgewiesen werden, was eine Apoptose-induzierende Funktion von P35¹⁻⁷⁶ ausschloss (Cartier et al., *Journal of Virology* 1994; LaCount and Friesen, *Journal of Virology* 1997). Offensichtlich wurde die antiapoptotische Funktion von Ac-P35 in diesen Zellen durch P35¹⁻⁷⁶ gehemmt. Immuno-Blot-Analysen zeigten, dass die Expression von vollständigem Ac-P35 bei gleichzeitiger Anwesenheit von P35¹⁻⁷⁶ stark gehemmt war. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Transkription von

viralem P35 in den P35¹⁻⁷⁶-Zellen nicht beeinträchtigt war und es wurde der Schluss gezogen, dass P35¹⁻⁷⁶ entweder die Synthese oder aber die Stabilität des volle-Länge P35-Proteins direkt oder indirekt herabsetzte (Cartier et al., *Journal of Virology* 1994). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse (s. o.) legen den Schluss nahe, dass eine direkte Inhibierung von Ac-P35 durch P35¹⁻⁷⁶ vorlag, wobei es zu einer Interaktion mit dem C-Terminus von Ac-P35 kam. Ac-P35 war dadurch vermutlich nicht mehr in der Lage, mit Caspasen zu interagieren, vielleicht weil es von P35¹⁻⁷⁶ in eine ungünstige Konformation gezwungen worden war. Folglich konnte die Apoptose in diesen Zellen ungehindert ablaufen. Denkbar ist weiterhin, dass Ac-P35 von P35¹⁻⁷⁶ derart blockiert wurde, dass es keine Di- oder Oligomere mit sich selbst bilden konnte. Ausgehend von der Hypothese, dass Ac-P35-Dimere die Interaktion von jeweils N- und C-Terminus erfordern (s. o.), ist es vorstellbar, dass die korrekte Anlagerung eines zweiten Monomers an das Heterodimer N-P35/P35, das eine von monomerem P35 nunmehr verschiedene räumliche Struktur besitzt, verhindert wird. Vielleicht verliert Ac-P35 an Stabilität in vivo, wenn es nicht dimerisieren kann und wird schneller abgebaut. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen zu erwähnen, die von Zoog et al. durchgeführt worden sind. Bei diesen Untersuchungen wurden Experimente mit Ac-P35-Proteinen durchgeführt, an dessen codierenden Gensequenzen ein Austausch von Nukleotiden vorgenommen worden ist. Diese Ac-P35-Mutanten interagierten im Yeast Two-Hybrid-System nicht miteinander und wurden in *E. coli* und Insektenzellen nur in geringen Mengen produziert (Zoog et al., *Journal of Biological Chemistry* 1999). Anscheinend hängt die stabile Expression des Ac-P35-Proteins mit der Fähigkeit zusammen, in vivo zu dimerisieren.

3. 3 Ac-P35 interagiert mit einer Komponente der humanen RNA-Polymerase II

Aus den verwendeten Genbibliotheken konnte durch den Einsatz des Yeast Two-Hybrid Systems in mehreren Screens eine cDNA identifiziert werden, die die vollständige kodierende Region der humanen RNA-Polymerase II-Untereinheit hRPB1 enthielt, und die offensichtlich mit Ac-P35 interagierte. Weiterhin wurde festgestellt, dass der N-Terminus von Ac-P35 für eine Interaktion mit hRPB1 ausreichte. Der C-terminale Teil von Ac-P35 konnte hingegen nicht mit hRPB1 interagieren. Dies ließ vermuten, dass Ac-P35 über seinen N-Terminus mit hRPB1 interagierte.

Die Interaktion des N-terminalen Teils von Ac-P35 mit hRPB11, wie sie mit dem Interaction-Trap-System gezeigt werden konnte, scheint die im Abschnitt 3. 2. 1 diskutierte besondere Rolle von N-P35 zu bestätigen. Weitere Interaction Trap-Studien mit Deletionsmutanten von hRPB11 sollten zur Klärung der Frage beitragen, welche Domänen von hRPB11 an der Interaktion mit Ac-P35 beteiligt sind.

Die Fähigkeit von Ac-P35, mittels seines N-Terminus' Bindungen mit anderen Proteinen einzugehen, wird ebenfalls von *Cartier et al.* angenommen. Diese Autoren vermuten, dass der N-Terminus von Ac-P35 eine funktionelle Domäne darstellt, die für die Interaktion mit sich selbst und anderen Proteinen notwendig ist (Cartier et al., *J Virol* 1994 und siehe Abschnitt 3. 2. 1).

Dass eine Interaktion zwischen Ac-P35 und dem zellulären Protein hRPB11 denkbar ist, wurde in Studien zur zellulären Lokalisation von Ac-P35 gezeigt. Bei diesen Studien wurden die Gensequenzen des Ac-P35- und des hRPB11- Proteins in Expressionsvektoren subkloniert und diese in HeLa-Zellen ko-transfiziert. Die Lokalisation der exprimierten Proteine wurde anschließend mittels konfokaler Mikroskopie ermittelt. Es konnte beobachtet werden, dass Ac-P35 und hRPB11 im Zytosol sowie auch in den Zellkernen der HeLa-Zellen ko-lokalisierten.

Die Autoren *Hershberger et al.* berichten ebenfalls über eine zytosolische und nukleäre Lokalisation von Ac-P35, nachdem sie Insektenzellen mit dem Wildtyp AcMNPV-Virus infiziert hatten. In den von diesen Autoren durchgeführten Untersuchungen konnte eine Assoziation des Ac-P35-Proteins mit nukleären Fraktionen beobachtet werden, jedoch waren nur vergleichsweise geringe Mengen des Ac-P35-Proteins mit den nukleären Fraktionen assoziiert (Hershberger et al., *J Virol* 1994). In den Lokalisationsstudien, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden sind, konnte beobachtet werden, dass nach Transfektion von HeLa-Zellen mit einem Ac-P35-Expressionsplasmid etwa 20-30% dieser Zellen das Ac-P35-Protein im Zellkern enthielten (nicht gezeigt). Offensichtlich besitzt das P35-Protein aus *Autographa californica* die Fähigkeit, in die Zellkerne von HeLa-Zellen zu wandern. Inwieweit diese Eigenschaft von Ac-P35 auf weitere Vertebratenzellen und auch Insektenzellen übertragbar ist, dürften zukünftige Lokalisationsstudien des Ac-P35-Proteins an verschiedenen Zelllinien offenbaren.

Etwas überraschend ist die Beobachtung, dass hRPB11 als Bestandteil der RNA-Polymerase II zytosolisch lokalisierte (s. o.). Dieser Befund ist bisher nicht publiziert worden und stellt eine bisher nicht bekannte Eigenschaft dieses Proteins dar. Vielleicht besitzt das hRPB11-Protein (sowie seine homologen Verwandten in Insektenzellen und weiteren eukaryontischen Organismen) bestimmte, noch nicht bekannte Funktionen im Zytosol von Zellen, wie etwa die

direkte Interaktion mit viralen Proteinen während einer viralen Infektion. Da die zytosolische Lokalisation des hRPB11-Proteins an Zellen beobachtet worden ist, die dieses Protein über-exprimierten, d. h. Mengen dieses Proteins enthielten, die wahrscheinlich deutlich höher lagen als unter physiologischen Verhältnissen, wäre es notwendig, die Lokalisation von endogenem hRPB11 zu untersuchen. Dies könnte erfolgen, indem man humane Zellen mit einem anti-hRPB11-Antikörper inkubiert, der mit einer fluoreszierenden Substanz markiert ist und diese Zellen anschließend im konfokalen Mikroskop untersucht. Eine zytosolische Lokalisation von endogenem hRPB11 würde mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf weitere, noch nicht bekannte Funktionen des hRPB11-Proteins hinweisen.

Über die Funktionen und Eigenschaften des hRPB11-Proteins ist inzwischen einiges bekannt. *Bruno et al.* berichten über die Interaktion von hRPB11 mit Keratin 19, einem Mitglied einer großen Proteinfamilie, aus denen die Intermediärfilamente bestehen. Anhand ihrer Untersuchungen vermuten diese Autoren, dass Keratin 19 eine Rolle bei der Regulierung der RNA-Polymerase II-Aktivität spielt (Bruno et al., *FEBS* 1999). *Fanciulli et al.* konnten eine Interaktion von hRPB11 mit Che-1, einem bislang unbekannten Protein, nachweisen. Die Autoren vermuten aufgrund ihrer Untersuchungen, dass Che-1 ein Bestandteil des Transkriptionsapparates sein könnte (Fanciulli et al., *FASEB* 2000). Weitere bekannte Eigenschaften und Funktionen des hRPB11-Proteins, beispielsweise die Interaktion mit hRPB3 oder die vermutete regulierende Funktion bei der Zelldifferenzierung, werden in späteren Abschnitten diskutiert (s. u.).

3. 3. 1 Mögliche Konsequenzen der Interaktion von Ac-P35 mit Komponenten des Transkriptionsapparates

Welche physiologische Bedeutung kommt einer Interaktion von Ac-P35 mit hRPB11 zu? Gehen wir zunächst kurz auf die Struktur und Funktion der RNA-Polymerasen ein:

RNA-Polymerasen sind Enzyme, die die Synthese von RNA katalysieren. Sie sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaut, in den drei organismenreichen Archebakterien, Eubakterien und Eukaryoten evolutionär konserviert und kommen in pflanzlichen Chloroplasten und in einigen Virus-Spezies vor. In den Eubakterien und Archebakterien ist eine einzige RNA-Polymerase für die Transkription der rRNA, mRNA und tRNA verantwortlich. In eukaryotischen Organismen sind dagegen drei verschiedene RNA-Polymerasen im Zellkern vorhanden: RNA-Polymerase I

katalysiert die Synthese von rRNA, RNA-Polymerase II ist für die Synthese von mRNA sowie einiger kleinerer nukleärer RNAs verantwortlich und RNA-Polymerase III katalysiert die Synthese der 5S rRNA, der tRNAs sowie einiger kleinerer nukleärer RNA-Spezies (Cramer et al., *Science* 2001; Ibelgauf, 1993; Van Holde, 1990).

Die RNA-Polymerase II hat eine zentrale Bedeutung für die Gen-Expression in Eukaryoten und stellt den Kern des Transkriptionsapparates dar. Die am besten untersuchte RNA-Polymerase II ist diejenige aus *Saccharomyces cerevisiae*, die aus 12 verschiedenen Polypeptiden (RPB1-12; RPB steht für: RNA-Polymerase B) zusammengesetzt ist und eine Molekülmasse von ca. 500 kDa besitzt. Die Struktur des Enzyms aus der Hefe kann wahrscheinlich stellvertretend für alle eukaryotischen RNA-Polymerase II-Strukturen betrachtet werden, da hinsichtlich der Aminosäuresequenzen ein hohes Maß an Konservierung zwischen den Arten herrscht (Cramer et al., *Science* 2000 u. 2001).

Bei der Initiierung der Transkription durch RNA-Polymerase II kommt es am Promotor eines Gens vor der eigentlichen mRNA-Synthese zur Bildung eines sog. Preinitiationskomplexes, eines Multiproteinkomplexes, der aus RNA-Polymerase II und basalen oder allgemeinen Transkriptionsfaktoren besteht (Langelier et al., *J. Biol Chem* 2001). Die allgemeinen Transkriptionsfaktoren werden vermutlich für die Transkription aller durch RNA-Polymerase II transkribierten Gene benötigt (Lodish, *Molekulare Zellbiologie*, 1996). Der Initiationskomplex enthält einschließlich der Polymerase mindestens 40 Polypeptide und hat eine Molekülmasse von mehr als 2 MDa (Lodish, *Molekulare Zellbiologie*, 1996). Während der anschließenden Elongationsphase katalysiert die RNA-Polymerase II die Verknüpfung von Ribonucleosidtriphosphaten am lokal aufgewundenen DNA-Strang.

Die Transkription von eukaryotischen Genen erfordert im Weiteren mehrere sog. Transkriptionsaktivatoren (Struhl, *Cell* 1999), die an Enhancern oder Promoter-nahen Elementen binden (Struhl, *Cell* 1999; Lodish, *Molekulare Zellbiologie*, 1996) und vermutlich in Wechselwirkung mit Komponenten des basalen Initiationskomplexes treten (Tjian and Maniatis, *Cell* 1994; Keaveney, *Mol Cell* 1998, und siehe Abb. 23). Im Gegensatz zu den Aktivatoren stehen die Repressoren, die die Transkription hemmen und wie die Aktivatoren modular aufgebaute Proteine mit voneinander trennbaren, DNA-bindenden und reprimierenden Domänen (bei Aktivatoren: aktivierende Domänen) darstellen (Lodish, *Molekulare Zellbiologie*, 1996).

Die Regulation der Transkription in einem vielzelligen Organismus erfolgt über (das Zusammenspiel von) Aktivatoren und Repressoren. Dies bedeutet, dass die in einem bestimmten Zelltyp eines vielzelligen Organismus exprimierten Gene durch die in diesem Zelltyp vorhandenen Aktivatoren und Repressoren festgelegt werden (Lodish, Molekulare Zellbiologie, de Gruyter, 1996).

Die mittels Interaction Trap-System festgestellte Interaktion zwischen Ac-P35 und einer Komponente der humanen RNA-Polymerase II ließ die Vermutung zu, das Ac-P35 Transkriptionsvorgänge beeinflussen kann.

In Studien zur Charakterisierung der molekularen Struktur eukaryotischer RNA-Polymerase II konnte eine Vielfalt an Interaktionen zwischen den einzelnen Untereinheiten der RNA-Polymerase II nachgewiesen werden. Beispielsweise wurde festgestellt, dass die Untereinheit hRPB11 ausschließlich mit einer weiteren Untereinheit, hRPB3, interagiert (Acker et al., *J Biol Chem* 1997; Fanciulli et al., *FEBS Letters* 1998). Analog dazu wurde auch die Interaktion zwischen RPB11 und RPB3 aus *Schizosaccharomyces pombe* festgestellt (Ishiguru et al., *J Mol Biol* 1998; Kimura et al., *J Biol Chem* 1997). Zusammen mit Ergebnissen aus Röntgenstrukturanalysen, die an RNA-Polymerase II aus der Hefe durchgeführt wurden (Cramer et al., *Science* 2000), ergibt sich ein sehr komplexes Bild der Struktur dieses Enzyms: die einzelnen Untereinheiten sind über ein kompliziertes Netz an Interaktionen miteinander verknüpft, was zu einer charakteristischen dreidimensionalen Gestalt des Enzyms führt.

Nun ist es vorstellbar, dass die Bindung des Ac-P35-Proteins an eine Komponente dieses komplexen Moleküls verschiedene Auswirkungen hat: Konformationsänderungen in mehreren Bereichen des Enzyms könnten die Folge sein. Dies wiederum könnte die Funktion des Enzyms so weit beeinträchtigen, dass eine korrekte Bindung an den Promoter nicht mehr gegeben wäre und die Transkription gehemmt würde. Die Folge eines solchen Vorganges könnte z. B. die Inhibierung der Proteinsynthese in der Zelle sein.

Eine Interaktion von Ac-P35 mit Teilen der Polymerase könnte aber auch zu einer Erhöhung der Transkriptionseffizienz führen, indem es beispielsweise die Rolle eines weiteren basalen Transkriptionsfaktors übernimmt und somit möglicherweise zur besseren Erkennung der Transkriptionsstartstelle und/oder Positionierung der Polymerase an den Promoter beiträgt. Möglicherweise fördert die Anwesenheit von Ac-P35 im Preinitiationskomplex auch die Bindung von aktivierenden Domänen bestimmter Transkriptionsaktivatoren, so dass es in bestimmten Zelltypen zu einer Erhöhung der Transkriptionsleistung an Promotoren käme.

Auch wäre eine Funktion von Ac-P35 als Repressor vorstellbar: von einigen Inhibitoren der Transkription ist bekannt, dass sie den basalen Transkriptionsfaktor TFIID von dem Promoter verdrängen oder die Interaktion von TFIID mit anderen basalen Faktoren blockieren (Buratowski, *Cell* 1994).

Es wurde bereits erwähnt, dass Ac-P35 durch Inhibierung der Transkription ein Abschalten der Proteinsynthese verursachen könnte. Die Infektion von Insektenzellen hat die Abschaltung der zellulären Proteinsynthese zur Folge, wobei eine Reduktion der zellulären mRNA-Synthese vorausgeht. Ein Abschalten der zellulären Genexpression wird normalerweise bei permissiven (d. h., das Virus kann sich in den infizierten Zellen vermehren) AcMNPV-Infektionen beobachtet. Die Reduktion der zellulären Proteinsynthese beginnt 18 h nach Infektion mit AcMNPV und ist nach 24 h vollständig. Im Gegensatz dazu beginnt die Abnahme von zellulären mRNA-Mengen bereits nach etwa 12 Std. (Du and Thiem, *J Virol* 1997; Carstens et al., *Virology* 1979; Dobos and Cochran, *Virology* 1980; Ooi and Miller, *Virology* 1988). Das P35-Protein aus *Autographa californica* wird schon sehr früh nach der Infektion transkribiert und ist nach 8-12 Std. in infizierten Zellen nachweisbar (Friesen and Miller, *J Virol* 1987; Nissen and Friesen, *J Virol* 1989; Hershberger et al., *J Virol* 1994). Das frühe Genprodukt Ac-P35 könnte nun die mRNA-Synthese durch Beeinträchtigung der RNA-Polymerase II-Funktion hemmen und somit indirekt für die Reduktion der zellulären Proteinsynthese verantwortlich sein. Eine Inhibierung der RNA-Polymerase II-Funktion durch ein virales Produkt von AcMNPV wird auch von Ooi und Miller angenommen (Ooi and Miller, *Virology* 1988). Unterstützt wird die Hypothese einer RNA-Polymerase II-Hemmung nicht zuletzt durch die Beobachtung, dass AcMNPV die Bildung einer neuartigen RNA-Polymerase induziert, die für die Transkription von späten Genen von AcMNPV verantwortlich ist (Fuchs et al., *J Virol* 1983; Grula et al., *J Virol* 1981). Hieraus ergibt sich ein hypothetisches Modell, wonach frühe virale Gene durch die zelleigene RNA-Polymerase transkribiert werden, diese jedoch im Verlauf der Infektion vom Ac-P35-Protein inhibiert wird, wodurch es zu einer Reduktion der zellulären mRNA- und Proteinsynthese kommt. In späteren Phasen des Infektionszyklus' übernimmt dann eine virus-kodierte oder -induzierte RNA-Polymerase die Transkription viraler Gene.

In einer nicht-permissiven Zelllinie der Insektenspezies *Lymantria dispar*, Ld652Y, kann sich AcMNPV nicht vermehren. Das Virus kann in die Zelle eindringen, und es werden virale sowie zelluläre mRNAs normaler Grösse transkribiert, jedoch wird sowohl die virale als auch die

zelluläre Proteinsynthese zu einem späten Zeitpunkt nach der Infektion angehalten (Goodwin et al., *In Vitro* 1978; McClintock et al., *J Virol* 1986; Morris and Miller, *J Virol* 1992; Morris and Miller, *Virology* 1993). Dies lässt den Schluss zu, dass das Anhalten der Proteinsynthese in diesen Zellen eine zelluläre Reaktion auf die virale Infektion darstellt. Du und Thiem vermuten, dass das AcP35-Protein an diesem Vorgang beteiligt ist. Sie schließen aus, dass diese Eigenschaft eine Folge der Apoptose-inhibierenden Wirkung von Ac-P35 ist, da sie zeigten, dass Apoptose und Proteinsynthesehemmung in den Zellen unabhängig voneinander ablaufen konnten. Diese Autoren vermuten, dass Ac-P35 über einen unbekannten Mechanismus die Proteinsynthese hemmt (Du and Thiem, *J Virol* 1997).

Die Arbeiten von Guzo et al deuten auf eine Hemmung des Transkriptionsapparates durch AcMNPV hin: in Experimenten mit AcMNPV-infizierten Ld652Y-Zellen konnten sie zeigen, dass eine Abnahme der Proteinsynthese sowie der zellulären mRNA-Synthese zu ungefähr gleichen Zeitpunkten stattfand (20-24 Std. nach Infektion), während die virale mRNA-Synthese über die Dauer der Inkubationszeit (bis 72 Std. nach Infektion) stabil aufrecht erhalten wurde. Anhand von Versuchen mit dem DNA-Polymerase-Inhibitor Aphidicolin konnten sie weiterhin zeigen, dass ein frühes virales Genprodukt für die Proteinsynthesehemmung in den Zellen verantwortlich sein musste. Aus diesen Beobachtungen zogen die Autoren den Schluss, dass ein frühes, virales Genprodukt durch selektiven Abbau bzw. Destabilisierung von zellulärer mRNA oder durch Inhibition von wichtigen Komponenten des Transkriptionsapparates, die Proteinsynthesehemmung in den untersuchten Zellen verursachte (Guzo et al., *J Virol* 1992). Dieses Genprodukt könnte nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit das P35-Protein aus *Autographa californica* sein, das mit der RNA-Polymerase II oder weiteren Komponenten des Transkriptionskomplexes in den Zellen interagiert.

3. 4 Ac-P35 und hRPB11 haben einen Einfluss auf die Transkription

Die Hypothese, dass Ac-P35 die Transkription zu beeinflussen vermag, wurde durch Promoterstudien überprüft. Hierbei wurde die Fähigkeit von Ac-P35 untersucht, die Aktivität verschiedener humaner Promotoren zu beeinflussen. Bei den Versuchen wurden Reporterkonstrukte eingesetzt, die die Untersuchung der Aktivität verschiedener Promotoren zuließen, und der Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität wurde in den menschlichen Zelllinien LoVo, 293T und Jurkat untersucht. Im Weiteren wurde der Interaktionspartner von Ac-P35, hRPB11, in diese Untersuchungen miteinbezogen. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl Ac-P35 als auch hRPB11 in der Lage waren, in der Zelle LoVo die Aktivität des humanen E-Cadherin und β -Actin-Promoters zu stimulieren. Die Anwesenheit beider Proteine wirkte additiv; die Promoteraktivität war etwa doppelt so hoch wie in dem Fall, in dem die beiden Proteine einzeln in den Zellen exprimiert worden waren. In den Zelllinien 293-T und Jurkat hingegen wurde die Aktivität der E-Cadherin- und des β -Actin-Promotoren sowie die aller übrigen getesteten Promotoren nicht durch Ac-P35 oder hRPB11 beeinflusst (siehe Ergebnisse, Abschnitt 2. 3). Diese Daten belegen, dass Ac-P35 die Transkription in menschlichen Zellen regulieren kann. Offensichtlich ist diese Eigenschaft von Ac-P35 nur in bestimmten Zelltypen gegeben; nur in der Darmzelllinie LoVo konnte die transkriptionsregulierende Eigenschaft von Ac-P35 beobachtet werden. Wahrscheinlich benötigt Ac-P35 dafür bestimmte Typen von Transkriptionsfaktoren und/oder anderen zellspezifischen Faktoren.

E-Cadherin ist ein Zelladhäsionsmolekül, das für die Entwicklung von Epithelien im Embryo sowie für den Zusammenhalt der meisten Epithelzellschichten Bedeutung besitzt. Große Mengen dieses integralen Membranglycoproteins finden sich beispielsweise an den Berührungsstellen von Epithelzellen, die als Zellschichten den Dünndarm oder die Nierentubuli auskleiden (Lodish, *Molekulare Zellbiologie*, 1996; Rubin et al., *Hum Pathol* 2001).

β -Actin ist Bestandteil des Actin-Cytoskeletts und ist an verschiedenen grundlegenden Zellfunktionen beteiligt (Lodish 1996, Kleinig und Sitte 1984). Die verwendeten, konstitutiv aktiven Promotoren der menschlichen E-Cadherin- und β -Actin-Gene kodieren also offensichtlich für Proteine, die in vielen Geweben und Zellarten exprimiert werden. In wie vielen Zelltypen das Ac-P35- und hRPB11-Protein diese (und andere) Promotoren jedoch regulieren können, dürften weitere Promoterstudien an verschiedenen Zelllinien klären helfen.

In Experimenten an hRPB11-überexprimierenden LoVo-Zellen konnte festgestellt werden, dass sowohl die endogenen E-Cadherin-mRNA- und Proteinmengen als auch die Aktivität eines in diese Zellen transfizierten E-Cadherin-Reporterkonstruktes erhöht wurden. In weiteren Experimenten mit den hRPB11-überexprimierenden LoVo-Zellen stellten die Autoren fest, dass die hRPB11-Expression in diesen Zellen zu einem stärker differenzierten Phänotyp und auch zu einer Reduzierung der Proliferationsrate dieser Zellen führte. Nach Injektion dieser Zellen in Mäuse konnte beobachtet werden, dass die Tumorbildung sowie die Metastasierung von Tumoren in den Mäusen gehemmt wurde. Aus diesen Beobachtungen leiten die Autoren die Vermutung ab, dass die hRPB11-Expression an der Regulation der Zelldifferenzierung beteiligt ist, indem die Transkription spezifischer Gene durch dieses Protein reguliert wird (Bruno et al., *FEBS* 1998).

In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt worden, dass Ac-P35 und hRPB11 humane Promotoren stimulieren können und somit in der Lage sind, Transkriptionsvorgänge zu beeinflussen. Es wäre nun von Interesse zu untersuchen, ob Ac-P35 auch ähnliche Wirkungen wie hRPB11 hinsichtlich der von *Bruno et al.* beschriebenen spezifischen Eigenschaften von hRPB11-überexprimierenden Zellen besitzt, insbesondere vor dem Hintergrund der in der vorliegenden Arbeit festgestellten Interaktion von Ac-P35 mit hRPB11. Eine Möglichkeit dies zu tun bestünde darin, Ac-P35 zum einen alleine, zum anderen gemeinsam mit hRPB11 in LoVo-Zellen zu exprimieren und diese Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie, ihren Wachstumseigenschaften und ihrer Fähigkeit, in Mäusen die Tumorbildung zu inhibieren, zu untersuchen. Dabei ließe sich feststellen, ob sich die beiden Proteine in ihren Wirkungen verstärken, wie dies bereits in den Promoterstudien beobachtet worden war (s. o.) oder möglicherweise gegenseitig antagonisieren.

In den obigen Ausführungen wurde eine mögliche Rolle von Ac-P35 bei der Regulation der Proteinsynthese in permissiven und nicht-permissiven Insektenzelllinien diskutiert. Aufgrund der Feststellung, dass Ac-P35 die Transkription in menschlichen Zellen zu regulieren vermag, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Eigenschaft von Ac-P35 auch in Insektenzellen beobachtbar ist. Dazu müsste der Einfluss des P35-Proteins auf verschiedene Reporterkonstrukte sowie auf den entsprechenden endogenen Promotoren in Insektenzellen überprüft werden. Im Weiteren wäre es notwendig, Experimente zu entwerfen, um den Einfluss von Ac-P35 auf die Proteinsynthese in Zelllinien verschiedener Insekten- und Vertebratenspezies zu untersuchen. Diese Untersuchungen dürften in nicht unerheblichem Umfang zur Charakterisierung des P35-Proteins aus *Autographa californica* beitragen.

3.5 Homodimerisierung des hRPB11-Proteins

Im Zuge der Interaction Trap-Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass hRPB11 dimerisieren konnte. Eine Interaktion von hRPB11 mit sich selbst ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden, wohl aber die Interaktion mit einer weiteren Polymerase II-Untereinheit, hRPB3 (s. o.). Dieses Protein ist mit einer Molekülmasse von 33 kDa die drittgrößte Untereinheit (nach hRPB1 u. 2) der menschlichen RNA-Polymerase II (Pati and Weissman, *J Biol Chem* 1990).

Von den eukaryotischen RPB11- und RPB3-Untereinheiten ist bekannt, dass sie zu der prokaryotischen α -Untereinheit eine begrenzte Aminosäuresequenzhomologie besitzen (Dequard-Chablat et al., *J Biol Chem* 1991; Martindale, *Nucleic Acid Res* 1990; Woychik et al, *Gene Expr* 1993). Die α -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase spielt eine entscheidende Rolle bei der Initiation der Transkription. Ferner spielt sie eine wichtige Rolle beim Zusammenbau der RNA-Polymerase: sie stellt durch Dimerisierung eine Plattform dar, an dem die Untereinheiten β und β' binden können. Der Komplex aus $\beta\beta'\alpha_2$ wird auch als Core-Enzym bezeichnet (Zhang and Darst, *Science* 1998; Ibelgaufts 1993).

Das humane Heterodimer hRPB11/hRPB3 und das eukaryotische Heterodimer RPB11/RPB3 werden als das funktionelle Gegenstück des α_2 -Dimers der bakteriellen RNA-Polymerase diskutiert (Bruno et al., *FEBS* 1999; Pati, *Gene* 1994; Zhang and Darst, *Science* 1998), während die Core-Sub-Einheit, bestehend aus RPB2, RPB3 und RPB11 als analoges Gegenstück zum $\alpha_2\beta$ -Komplex, der als Zwischenglied beim Zusammenbau der prokaryotischen RNA-Polymerase entsteht, betrachtet wird (Ishiguro et al., *J Mol Biol* 1998; Kimura et al., *J Biol Chem* 1997; Mitobe et al., *Curr Genet* 2001).

Es besteht nun die Möglichkeit, dass das hRPB11-Homodimer, wie es in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, in vivo existiert und dass sich dieses Dimer unter bestimmten Bedingungen bildet.

Es wird angenommen, dass die RNA-Polymerase II aus der Hefe unter bestimmten Bedingungen wie Stress die Zusammensetzung ihrer Untereinheiten variieren kann (Choder and Young, *Mol Cell Biol* 1993; Fanciulli et al., *FEBS* 1998; Woychik et al., *J Biol Chem* 1991). Es ist also denkbar, dass unter bestimmten Bedingungen oder zu bestimmten Zeitpunkten ein hRPB11/hRPB11-Homodimer im Enzymkomplex entsteht und einen Einfluss auf die Genexpression ausübt. Da RPB11 ein Bestandteil der eukaryotischen Core-Sub-Einheit ist und diese an DNA binden kann (Kimura et al., *J Biol Chem* 1997), ist es vorstellbar, dass ein hRPB11-Homodimer

in der Core-Einheit der RNA-Polymerase II die Bindung an Promotoren und/oder für die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren (an die RNA-Polymerase) mitverantwortlich ist und somit an der Regulation der Transkription beteiligt ist. Dies wird nicht zuletzt durch die Tatsache unterstützt, dass das homologe Gegenstück zu hRPB11, die prokaryotische α -Untereinheit (s. o.), an der Promotorerkennung beteiligt ist, indem es mit einem Upstream Promoter-Element interagiert (Ross, *Science* 1993; Gourse, *Mol Microbiol* 2000) und im Weiteren mit einer Vielzahl von Transkriptionsaktivatoren interagieren kann (Diskussion in Ishihama, *J Bacteriol* 1993 und Ebright and Busby, *Curr Opin Genet Dev* 1995).

Von einer weiteren Untereinheit der humanen RNA-Polymerase II ist bekannt, dass sie mit einem viralen Transkriptionsaktivator interagieren kann: die Untereinheit hRPB5 interagiert mit dem viralen Transkriptionsaktivatorprotein HBx aus dem Hepatitis B-Virus (Cheong et al., *EMBO* 1994). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass hRPB5 zum einen homodimerisieren kann, zum anderen mit hRPB3 interagieren kann (Acker et al., *J Biol Chem* 1997). Die Interaktion von hRPB11 mit hRPB3 wurde bereits erwähnt, ebenso die Homodimerisierung des hRPB11-Proteins. Es ist nun vorstellbar, dass hRPB11 ebenfalls von einem viralen Protein zur Regulation der Genexpression benutzt wird.

3. 6 Die Aminosäuresequenzen von Ac-P35 und hRPB3 sind einander ähnlich

Die Tatsache, dass hRPB11 sowohl mit hRPB3 (s. o.) als auch mit Ac-P35 (diese Arbeit) interagiert lässt die Vermutung zu, dass hRPB11 in vivo gleichzeitig mit hRPB3 und Ac-P35 interagieren kann und dass solch eine Interaktion physiologisch bedeutsam ist. Weiterhin kann die Frage gestellt werden, ob hRPB3 und Ac-P35 strukturelle Gemeinsamkeiten besitzen oder ob sogar eine Homologie zwischen diesen beiden Proteinen vorhanden ist. Um dies zu überprüfen wurden die Aminosäuresequenzen von Ac-P35 und hRPB3 miteinander verglichen. Gleichzeitig wurden Aminosäuresequenzen des Ac-P35-homologen Proteins aus dem Baculovirusstamm *Bombyx mori* NPV sowie weitere hRPB3-Homologe aus verschiedenen Organismen in die Untersuchung miteinbezogen. Die vergleichende Untersuchung der Aminosäuresequenzen wurde am Computer mit Hilfe der Alignment-Programme Clustal und MACAW durchgeführt. Es zeigte sich, dass besonders in zwei Sequenzabschnitten deutliche Anhäufungen von identischen und ähnlichen Aminosäuren auftraten. Weiterhin fiel auf, dass das Motiv Phe-Glu-

Tyr in allen Sequenzen konserviert zu sein schien. Es ist z. Z. nicht möglich, eine eindeutige Homologie zwischen P35 und den hRPB3-homologen Proteinen festzustellen, jedoch sind die über weite Bereiche vorhandenen Ähnlichkeiten sowie das in allen Proteinen vorhandene Motiv Phe-Glu-Tyr Anzeichen dafür, dass sich das P35-Protein aus *Autographa californica* und das Protein hRPB3 zumindest ähnlich sind. Inwieweit diese beiden Proteine eine stammesgeschichtliche Verwandtschaft besitzen, müsste durch eingehendere Untersuchungen geklärt werden. Beispielsweise wäre es von Interesse zu überprüfen, ob sie miteinander interagieren können. Im Weiteren ist bekannt, dass RPB3 aus der Hefe für das Überleben der Zellen notwendig ist (Woychik and Young; *TIBS* 1990). Es könnte also in einem Komplementations-Assay untersucht werden, ob die Expression von Ac-P35 eine hRPB3-Defizienz in Zellen kompensieren kann. Diese und weitere Untersuchungen dürften dazu beitragen, diese beiden Proteine hinsichtlich ihrer Funktionen und einer möglichen Verwandtschaft näher zu charakterisieren.

Bei der Betrachtung der Sequenz Asp-Ile-Val-Asp (AS 77-80) des hRPB3-Proteins fällt auf, dass eine relativ hohe Ähnlichkeit zur Caspasenerkennungssequenz Asp-Gln-Met-Asp des Ac-P35-Proteins besteht. Möglicherweise kann hRPB3 von Caspasen gespalten werden. Dies wurde im Experiment überprüft. Dazu wurden Insektenzellen mit einem hRPB3-GST-Konstrukt infiziert und Lysate dieser Zellen gewonnen. Zu diesen Lysaten wurde gereinigte Caspase-3 zugegeben und mit einem anti-GST-Antikörper wurde im Western-Blot auf Spaltprodukte des hRPB3-Proteins geprüft. Es konnten jedoch keine Spaltprodukte von hRPB3 nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Mit diesem Experiment konnte eine Spaltung von hRPB3 durch Caspase-3 nicht nachgewiesen werden.

Abschließend kann hier festgehalten werden, dass die festgestellte Ähnlichkeit in der Primärstruktur zwischen Ac-P35 und hRPB3 ein weiteres Indiz für die weiter oben diskutierte (und mittels Promoter-Assay gezeigte) transkriptionsregulierende Eigenschaft von Ac-P35 sein könnte: vielleicht reicht die Ähnlichkeit mit hRPB3 aus, um mit weiteren Bindungspartnern von hRPB3 in der Polymerase zu interagieren bzw. um das hRPB3-Protein von seinen Bindungspartnern zu verdrängen und somit das komplizierte Netzwerk an Protein-Protein-Interaktionen in der RNA-Polymerase II empfindlich zu stören oder zu beeinflussen.

3.7 Die CARD-Domäne von Apaf-1 interagiert mit einem Fragment des hVPS41-Proteins

Dieser Teil der Aufgabenstellung beinhaltete die Suche und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Caspasenadaptormoleküls Apaf-1. Die Aufgabenstellung ergab sich aus einem Vergleich der Phänotypen von Apaf-1^{-/-}- und Caspase-9^{-/-}-Knockout-Mäusen, wobei festgestellt werden konnte, dass die Apaf-1^{-/-}-Knockout-Tiere insgesamt einen schwerwiegenderen Phänotyp aufwiesen. Dies bedeutet, dass Apaf-1 neben der Aktivierung von Caspase-9 möglicherweise noch weitere Funktionen besitzt; es wurde angenommen, dass Apaf-1 auch mit weiteren zellulären Proteinen interagieren kann (siehe Problemstellung).

Um nach Interaktionspartnern von Apaf-1 zu suchen, wurden die DNA-Sequenzen der zwei funktionellen Domänen CARD und WD-40 In-Frame mit der LexA-Sequenz kloniert und als „Köder“ im Interaction Trap-System eingesetzt. Mit jedem dieser „Köder“ wurden zwei Interaction Trap-Screens durchgeführt, wobei mehrere blaue Kolonien erhalten werden konnten, aus denen die potentiellen Interaktor-Plasmide isoliert und auf spezifische Interaktion mit den jeweiligen Apaf-1-Domänen geprüft wurden. Es konnte kein spezifischer Interaktionspartner zur WD-40-Domäne identifiziert werden, da keines der rücktransformierten Interaktor-Plasmide aus den WD-40-Screens zu einer Blaufärbung der Hefekolonien führte. Hingegen kam es in einem von mehreren blauen Hefeklonen aus den CARD-Screens zu einer spezifischen Interaktion zwischen einem Protein aus der Genbank und der CARD-Domäne von Apaf-1. Die Analyse der cDNA-Sequenz dieses Proteins unter Zuhilfenahme von Gendatenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information) ergab, dass es sich um ein Fragment aus dem 3'-Ende der cDNA-Sequenz des humanen Proteins VPS41 (hVPS41) handelte. Dieses Fragment umfasste die letzten 176 Aminosäuren (AS 678 bis 854) des vollständigen hVPS41-Proteins. Es wird im folgenden mit hVPS41⁶⁷⁸⁻⁸⁵⁴ bezeichnet.

Um zu überprüfen, ob die Interaktion von hVPS41⁶⁷⁸⁻⁸⁵⁴ mit der CARD-Domäne von Apaf-1 spezifisch für das Apaf-1-Protein war, wurde untersucht, ob hVPS41⁶⁷⁸⁻⁸⁵⁴ mit den CARD-Domänen weiterer Proteine interagieren konnte. Hierzu wurde mit Hilfe des Interaction Trap-Systems untersucht, ob die CARD-Domäne der Caspase-2- und der Caspase-9 mit hVPS41⁶⁷⁸⁻⁸⁵⁴ interagierte. Die Interaction Trap-Untersuchungen ergaben, dass die Reportergene LEU2 und LacZ in den transformierten Hefezellen nicht aktiviert worden waren und dass es somit nicht zu Interaktionen zwischen hVPS41⁶⁷⁸⁻⁸⁵⁴ und den CARD-Domänen von Caspase-2 und Caspase-9

gekommen war. Daraus kann geschlossen werden, dass hVPS41⁶⁷⁸⁻⁸⁵⁴ mit hoher Wahrscheinlichkeit nur mit der CARD-Domäne von Apaf-1 interagiert, nicht jedoch mit den CARD-Domänen anderer Proteine wie beispielsweise Caspasen.

Das Protein hVPS41 ist das humane Homolog des früher charakterisierten VPS41-Proteins aus *S. cerevisiae*. Weiterhin sind strukturelle Homologe aus der Tomate und aus *C. elegans* und *D. melanogaster* identifiziert worden (Radisky et al., *Proc. Natl. Acad Sci USA* 1997; Warner et al., *Genome* 1998).

VPS41 aus der Hefe ist an dem Transport des Membranenzyms alkalische Phosphatase von dem Golgi-Apparat zur Vakuole beteiligt (Bryant and Stevens, *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; Cowles et al., *EMBO* 1997). Es konnte gezeigt werden, dass VPS41 an den Adaptorproteinkomplex AP-3 binden kann (Rehling et al., *Nat Cell Biolog* 1999). Dieses Adaptorprotein bindet an „Cargo-Proteine“ (Proteine, die in die Vakuole transportiert werden sollen, Darsow et al., *J cell Biol* 1998; Honing et al., *EMBO* 1998) und dirigiert diese in aus dem Golgi-Apparat abgeleiteten Transportvesikeln, welche anschließend zur Vakuole transportiert werden (Rehling, *Nat Cell Biol* 1999). Es wird angenommen, dass ein Zusammenspiel zwischen AP-3 und VPS41 für die Ausbildung von Transportvesikeln verantwortlich ist und dass das VPS41-Protein in den entstehenden Transportvesikeln integriert wird (Darsow et al., *Mol Biol Cell* 2001; Rehling et al., *Nat Cell Biolog* 1999). Weiterhin ist VPS41 Teil eines großen Proteinkomplexes auf der Vakuolenmembran (Nakamura et al., *J Biol Chem* 1997) und spielt bei der Fusion einzelner Vakuolen eine Rolle (Price et al., *J Cell Biol* 2000).

Es stellt sich nun die Frage, ob diese Eigenschaften und Funktionen auf das homologe humane Protein hVPS41 übertragen werden können.

Anhand von Immuno-Blot-Experimenten an Vertebratenzellen stellten Ward et al fest, dass hVPS41 in der zytosolischen Fraktion enthalten war und mit der Membranfraktion assoziierte. Außerdem stellten sie fest, dass die C-terminale RING-H2-Domäne von hVPS41 für die Interaktion mit der Membranfraktion verantwortlich war. In Lokalisationsstudien konnten die Autoren weiterhin zeigen, dass die RING-H2-Domäne an Vesikeln lokalisiert war, die dem Golgi-Apparat entstammten (Ward et al., *Exp Cell Res* 2001). Zusammen mit publizierten Daten des hVPS41-Homologs aus der Hefe (s. o.) ist es sehr wahrscheinlich, dass das humane Homolog hVPS41 an der Bildung von Transportvesikeln am Golgi-Apparat beteiligt ist und

möglicherweise am Transport von Proteinen aus dem Golgi-Apparat in weitere Zellkompartimente beteiligt ist.

Die Beobachtung, dass hVPS41⁶⁷⁸⁻⁸⁵⁴, das die RING-H2-Domäne enthält, mit der CARD-Domäne von Apaf-1 interagiert (diese Arbeit) lässt die Vermutung zu, dass das Adaptormolekül Apaf-1 im Golgi-Apparat lokalisiert sein könnte. In Arbeiten von Ruiz-Vela *et al.* wird eine Lokalisation von endogenem sowie überexprimiertem Apaf-1 im Zytoplasma sowie im Golgi-Apparat von Vertabratenzellen beschrieben (Ruiz-Vela *et al.*, *FEBS* 2001). Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass die gleichzeitige Expression des Antiapoptose-Proteins Bcl-2 zu einer Relokalisierung von Apaf-1 aus dem Golgi-Apparat in perinukleäre Kompartimente führt. Die Autoren schließen eine direkte Interaktion zwischen Apaf-1 und Bcl-2 aus, da von ihnen durchgeführte Yeast Two-Hybrid-Experimente eine solche Interaktion nicht zeigten. Außerdem liegen publizierte Daten vor, die zeigen, dass Apaf-1 keine Interaktionen mit Mitgliedern der Bcl-2-Familie eingeht (Moriishi *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und der postulierten Rolle von hVPS41 beim Proteintransport kann die Hypothese aufgestellt werden, dass hVPS41 direkt mit Apaf-1 am Golgi-Apparat interagiert und für den intrazellulären Transport von Apaf-1 verantwortlich ist. Möglicherweise ist hVPS41 daran beteiligt, Apaf-1 in transitorische Vesikel zu verpacken, die dieses Protein im Zytoplasma verteilen. Des Weiteren ist eine direkte Beteiligung von hVPS41 an einer möglichen Verteilung von Apaf-1 im Zytoplasma denkbar, da beide Proteine in Lokalisationsstudien ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster aufweisen (s. o.) und somit die Möglichkeit einer direkten Interaktion gegeben ist. Vielleicht ist hVPS41 auch an der Aktivierung von Caspase-9 beteiligt, indem es beispielsweise Apaf-1 zu der Caspase transportiert und die Interaktion zwischen beiden vermittelt. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass VPS41 aus *S. cerevisiae* oligomerisieren kann (Darsow *et al.*, *Mol Biol Cell* 2001). In der Annahme, dass dies auch für hVPS41 gilt, kann vermutet werden, dass eine Oligomerisierung von hVPS41 zur Oligomerisierung von Apaf-1 beitragen könnte. Die Oligomerisierung von Apaf-1 ist für die Aktivierung von Caspase-9 notwendig (Srinivasula *et al.*, *Mol Cell* 1998; Adrian *et al.*, *J Biol Chem* 1999). Andererseits ist es möglich, dass hVPS41 ein negativer Regulator von Apaf-1 ist, indem es an Apaf-1 bindet und es dadurch sterisch behindert. Folglich könnte Apaf-1 womöglich kein funktionelles Apoptosom bilden und Procaspase-9 nicht aktivieren. Auf diese Weise könnte das hVPS41-Protein während der Apoptose als Inhibitor wirken, indem es die intrazellulären Apaf-1-Mengen, die für die Procaspase-9-Aktivierung notwendig sind, herabsetzt. Diese mögliche Eigenschaft von hVPS41

müsste anhand geeigneter Experimente näher untersucht werden. In diesem Zusammenhang bliebe zu klären, welche Veränderungen am hVPS41-Protein während der Apoptose vor sich gehen. Beispielsweise wäre die intrazelluläre Lokalisation dieses Proteins zu analysieren und die mögliche Eigenschaft von hVPS41 zu untersuchen, in menschlichen Zellen höher molekulare Komplexe mit sich selbst und/oder mit Apaf-1 zu bilden.

In den obigen Überlegungen wird davon ausgegangen, dass vollständiges hVPS41 mit Apaf-1 interagieren kann. Aus den Arbeiten von *Ward et al* (s. o.) und der in dieser Arbeit festgestellten Interaktion zwischen der CARD-Domäne von Apaf-1 und hVPS41⁶⁷⁸⁻⁸⁵⁴ kann geschlossen werden, dass die Interaktion zwischen den beiden vollständigen Proteinen in vivo möglicherweise über die jeweiligen Domänen, die RING-H2-Domäne und die CARD-Domäne, erfolgt. Um jedoch die Interaktion zwischen den vollständigen Proteinen genauer zu bestimmen, müsste man beide Proteine in ihrer gesamten Länge klonieren und mittels geeigneter Experimente untersuchen. Solche Experimente könnten beispielsweise Interaction Trap- oder Ko-Präzipitierungsexperimente sein. Außerdem könnte man hVPS41⁶⁷⁸⁻⁸⁵⁴ in Zellen überexprimieren und anschließend die intrazelluläre Lokalisation von Apaf-1 bestimmen. Eine unveränderte Lokalisation von Apaf-1 würde auf eine Interaktion zwischen Apaf-1 und hVPS41, die nicht durch hVPS41⁶⁷⁸⁻⁸⁵⁴ gestört wird, hindeuten.

4. Material und Methoden

4.1 Material

In diesem Abschnitt werden alle Geräte und Reagenzien aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet worden sind. Nicht aufgeführt sind die üblichen Labormaterialien wie z. B.

Analysenwaagen, Zentrifugen- und Rundbodenröhrchen, Sterilfilter, Parafilm[®], Petrischalen, 1,5 ml Reaktionsgefäße, Mikroliterpipetten, Glasgefäße etc.

4.1.1 Chemikalien, Biochemikalien

Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (29:1)	Biorad, Hercules, CA, USA
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (37,5:1)	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Adenin	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
Albumin, Bovine (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Amberlite	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin (Na-Salz)	Sigma, Deisenhofen
Arginin	Sigma, Deisenhofen
Aspartat	Sigma, Deisenhofen
Bacto Agar	Difco, Detroit, Mi, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, Mi, USA
Borsäure (100 %ig)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Click/RPMI-Trockenmedium	Biochrom, Berlin
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Boehringer, Mannheim (Roche)
Dextranblau	Sigma, Deisenhofen
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
DMEM-Trockenmedium	Biochrom, Berlin
DTT	Sigma, Deisenhofen
Entellan [®]	Merck, Darmstadt
Essigsäure (100 %ig, p. a.)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96 %ig, p. a.)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Formalin-Lösung (37 %ig)	Roth, Karlsruhe
Formamid (100 %ig)	Fluka, Neu-Ulm

Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
D-Galactose	Difco, Detroit, Mi, USA
Gelatine (für die PCR)	Sigma, Deisenhofen
D-Glucose	Difco, Detroit, Mi, USA
Glutamat	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Fluka, Neu-Ulm
Hefeextrakt	Difco, Detroit, Mi, USA
HEPES	Biochrom, Berlin
L-Histidin	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol (100 %ig)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxyd (fest)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin (Kanamycin A Monosulfat)	Sigma, Deisenhofen
L-Leucin	Sigma, Deisenhofen
Lithiumacetat (Dihydrat)	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Magnesiumchlorid (Hexahydrat)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol (99 %ig, p. a.)	Merck, Darmstadt
Methionin	Sigma, Deisenhofen
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Natriumhydrogencarbonat	Biochrom, Berlin
Natriumhydroxyd (fest)	Merck, Darmstadt
PBS Dulbecco (w/o Ca^{2+} , Mg^{2+})	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol 3350, 4000	Merck, Darmstadt
Polyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen
L-Phenylalanin	Sigma, Deisenhofen
5x Reporter-Lysepuffer	Promega, Madison, WI, USA
RPMI 1640 Medium (mit GlutaMAX-I TM)	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
Salmon Sperm DNA (Na-Salz)	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure (25 %ig, p. a.)	Roth, Karlsruhe
Saponin	Roth, Karlsruhe
L-Serin	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
L-Threonin	Sigma, Deisenhofen
Tris (hydroxy-methyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Biorad, Hercules, CA, USA
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 % w/v)	Biochrom, Berlin

L-Tryptophan	Sigma, Deisenhofen
L-Tyrosin	Sigma, Deisenhofen
Uracil	Sigma, Deisenhofen
L-Valin	Sigma, Deisenhofen
Vancomycin	Sigma, Deisenhofen
Wasser für die Chromatographie (LiChrosolv [®])	Merck, Darmstadt
X-Galaktopyranosid (X-Gal)	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
Yeast Nitrogen Base w/o AS	Difco, Detroit, Mi, USA

4. 1. 2 Antikörper

Name	Herkunft	Eigenschaften	Verwendung	Hersteller
Anti-LexA Antibody	Kaninchen	Polyklonal, gegen LexA Bindungsdomäne gerichtet	Überprüfung der Expression von Bait-Fusionsplasmiden im Western-Blot	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Rabbit IgG	Ziege	Anti-Kaninchen Antikörper, Meerrettich-peroxidase-konjugiert	Zweit-Antikörper zur Detektion der Bait-Fusionsplasmide im Western-Blot	Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach
Anti-P35-Antiserum	Kaninchen	Polyklonales Immunglobulin-Antiserum, gegen Ac-P35-Protein gerichtet	Detektion von viralem und zellulärem P35-Protein im Western-Blot (Vorarbeiten),	Eigene Herstellung: Ac-P35 in Bakterien exprimiert, aufgereinigt und in Kaninchen injiziert. Anschließend Gewinnung des Serums.
Anti-FLAG [®] M2 Antibody	Maus	Monoklonaler IgG ₁ -Antikörper, gegen FLAG-Fusionsproteine gerichtet	Erst-Antikörper bei Bestimmung der Ac-P35-Lokalisation in HeLa-Zellen	Sigma, Deisenhofen
Cy3 [™] -conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Ziege	Anti-Maus-Antikörper, Cy3-konjugiert	Zweit-Antikörper bei Bestimmung der Ac-P35-Lokalisation in HeLa-Zellen	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, USA

4.1.3 Enzyme

Hier sind diejenigen Enzyme aufgelistet, die für Klonierungsexperimente eingesetzt wurden. Restriktionsenzyme, die dazu eingesetzt wurden, den Einbau bzw. die Orientierung eines DNA-Fragments in einen Klonierungsvektor zu überprüfen, werden hier nicht im Einzelnen aufgeführt. Alle Enzyme wurden mit den entsprechenden 10x-Inkubationspuffern des jeweiligen Herstellers mitgeliefert.

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Klenow Enzym	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Pfu Turbo DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
T4 DNA Ligase	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
T4 DNA Polymerase	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Taq- DNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
RNAse A	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme (BamHI,	BioLabs, New England
EcoRI, HindIII, SacI, Sall,	GibcoBRL, Rockville, MD, USA
SmaI, XhoI)	MBI Fermentas, Wilna, Litauen

4.1.4 Plasmide/Vektoren

Auf die Konstruktion von Plasmiden, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, wird nicht im Detail eingegangen (Ausnahme: pLexA/p35 und pGEM-7/p35); sie wurden durch konventionelle Klonierungstechniken generiert (vgl. Abschnitt 4.2.1.11).

4.1.4.1 Interaction Trap-Vektoren/Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Interaction Trap-Fusionsplasmide mit Ausnahme von pLexA/CARD(Caspase-9), pLexA/CARD(Caspase 2), pLexA/Int β_7 und pJG4-5/ GABI wurden sequenziert, um den Erhalt des Leserahmens bei der Subklonierung der DNA-Sequenzen in die jeweiligen Bait- oder Prey-Ausgangsvektoren zu bestätigen.

Vektor/ Plasmid	Eigenschaften	Insert-DNA	Referenz
pLexA202	Ausgangsvektor für die Konstruktion von Bait-Fusionsplasmiden; Amp ^r , HIS-Selektionsmarker, ADH-Promoter, LexA-Gen (kodiert für AS 1-202), ADH-Terminationssignal, Größe: 10000 Bp		Rietzler und Holzmann, Technische Universität München ^a
pLexA/p35	Bait-Fusionsplasmid	Kodierende Region des p35-Gens (kodiert für Aminosäure 1-299) aus <i>Autographa californica</i> , Größe des subklonierten Inserts: ca. 1000 Bp	Eigene Herstellung (Abschnitt 4. 2. 1. 11., Punkt 10)
pLexA/ C-p35	Bait-Fusionsplasmid	C-terminale Sequenz (kodierend für Aminosäure 132-299) der kodierenden Region des p35-Gens aus <i>Autographa californica</i> , Größe des subklonierten Inserts: ca. 600 Bp	Eigene Herstellung
pLexA/ N-p35	Bait-Fusionsplasmid	N-terminale Sequenz (kodierend für Aminosäure 1-147) der kodierenden Region des p35-Gens aus <i>Autographa californica</i> , Größe des subklonierten Inserts: 440 Bp	Eigene Herstellung
pLexA/ hRPB11	Bait-Fusionsplasmid	Komplette kodierende Sequenz der humanen RNA-Polymerase II-Untereinheit 11 (kodierend für Aminosäure 1-117), Größe des Inserts: 362 Bp	Eigene Herstellung
pLexA/ CARD (Apaf-1)	Bait-Fusionsplasmid	CARD-Domäne von Apaf-1 (<i>H. sapiens</i>) (Wilhelm and Häcker), unveröffentlicht), Größe des Inserts: 266 Bp	Eigene Herstellung
pLexA/ WD-40 (Apaf-1)	Bait-Fusionsplasmid	WD-40-Domäne von Apaf-1 (<i>H. sapiens</i>) (Wilhelm and Häcker), unveröffentlicht) Größe des Inserts: 1992 Bp	Eigene Herstellung

pLexA/ CARD (Caspase-9)	Bait-Fusionsplasmid	CARD-Domäne von Caspase-9 (<i>Homo sapiens</i>) (Wilhelm and Häcker, unveröffentlicht), Größe des Inserts: 227 Bp	Eigene Herstellung
pLexA/ CARD (Caspase-2)	Bait-Fusionsplasmid	CARD-Domäne von Caspase-2 <i>Homo sapiens</i> , (Wilhelm and Häcker, unveröffentlicht), Größe des Inserts: 251 Bp	Eigene Herstellung
pLexA/ Int β_7	Bait-Plasmid, dass im Hefestamm <i>S. cerev.</i> EGY 48/pJK103/Integrin β_7 enthalten ist und dessen Fusionsprotein mit dem Fusionsprodukt des Prey- Plasmids pJG4-5/GABI interagiert	Gesamte zytoplasmatische Domäne von humanem Integrin β_7	Rietzler et al., <i>J Biol Chem</i> 1998 ^b
pYESTrp	Prey-Vektor, Klonierungsvektor für <i>Hybrid Hunter</i> TM -c-DNA- Genbanken; Amp ^r , <i>TRP1</i> - Selektionsmarker, <i>GALI</i> - Promoter, Nukleus- Lokalisationssequenz NLS, Aktivierungsdomäne B42 (245 Bp), <i>CYC1</i> Terminationssignal, Größe: 5800 Bp	cDNA-Fragmente von Genbanken, die aus Jurkat- Zellen und humanem Placenta Gewebe gewonnen wurden	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (Manual <i>Hybrid Hunter</i> TM , Version A) ^b
pYESTrp/ hRPB11 (k 95.1)	Mittels Interaction Trap- System (Screen Nr. 3 _{12,2} , siehe Abschnitt 2. 1. 1) isoliertes Prey-Plasmid, dessen Fusionsprotein B42/hRPB11 mit dem Fusionsprotein LexA/p35 interagierte, Ausgangs- vektor für Klonierung des Expressionsplasmids pEFSEM/ hRPB11	hRPB11-cDNA aus Hybrid <i>Hunter</i> TM Jurkat und Human Placenta c-DNA- Genbank, Größe des Inserts (nach Eco RI-Verdau): ca. 580 Bp	
pJG4-5	Ausgangsvektor für die Konstruktion von Prey- Fusionsplasmiden; Amp ^r , <i>TRP1</i> - Selektionsmarker, <i>GALI</i> - Promoter, Nukleus- Lokalisations-sequenz NLS, Aktivierungsdomäne B42, ADH-Terminationssignal, Größe: 6449 Bp		Rietzler u. Holz- mann, Techn. Univ. München ^a ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (Manual <i>Hybrid Hunter</i> TM , Version A) ^b

pJG4-5/p35	Prey-Fusionsplasmid	Kodierende Region des p35-Gens aus <i>Autographa californica</i> , Größe des subklonierten Inserts: ca. 1000 Bp	Eigene Herstellung
pJG4-5/N-p35	Prey-Fusionsplasmid	N-terminale Sequenz der kodierenden Region (s.o.) des p35-Gens aus <i>Autographa californica</i> , Größe des subklonierten Inserts: 440 Bp	Eigene Herstellung
pJG4-5/GABI	Mittels Interaction Trap-System isoliertes Prey-Plasmid, dessen Fusionsprotein mit humanem Integrin β_7 interagiert	cDNA-Fragment von einer Genbank, die aus Jurkat-Zellen gewonnen wurde und dessen vollständige Sequenz die Bezeichnung GABI erhielt (GABI wurde später in WAIT-1 umbenannt)	Rietzler und Holzmann, Technische Universität München ^a
pSH18-34	LacZ-Reporterplasmid, das im Hefestamm <i>S. cerev.</i> EGY 48/pSH18-34 enthalten ist; Amp ^r , URA3-Selektionsmarker, 8 LexA Operator-Bindungsstellen, LacZ-Gen, Größe: 10,5 Kb		Estojak et al., <i>Mol Cell Biol</i> 1995 ^b ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (Manual <i>Hybrid Hunter</i> TM , Version A) ^b
pJK103	LacZ-Reporterplasmid, das im Hefestamm <i>S. cerev.</i> EGY 48/pJK103/Integrin β_7 enthalten ist; Amp ^r , URA3-Selektionsmarker, 2 LexA Operator-Bindungsstellen, LacZ-Gen, Größe: 10,3 Kb		Estojak et al., <i>Mol Cell Biol</i> 1995 ^b ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA ^b

^a Plasmid/Vektor wurde zur Verfügung gestellt^b Plasmid/Vektor ist in dieser Publikation beschrieben

4. 1. 4. 2 Sonstige Ausgangsplasmide und -vektoren

Name	Eigenschaften	Insert-DNA	Referenz
pBluescript/p35	Ausgangsplasmid für die Klonierung der Bait-Fusionsplasmide pLexA/p35, pLexA/N-p35, pJG4-5/N-p35 und pLexA/C-p35; Amp ^r , T7/T3-Promoter (für in vitro Translation)	Kodierende Region des p35-Gens aus <i>Autographa californica</i>	Hay et al., <i>Cell</i> 1995 ^b
pGEM-7/p35	Ausgangsplasmid für die Klonierung des Bait-Fusionsplasmids pLexA/p35 sowie des Prey-Plasmids pJG4-5/p35; Amp ^r , T7/SP6-Promoter	Kodierende Region des p35-Gens aus <i>Autographa californica</i>	Eigene Herstellung (Abschnitt 4. 2. 1. 11., Punkt 7)
pcDNA3/Apaf-1	Ausgangsplasmid für die Klonierung der Bait-Fusionsplasmide pLexA/CARD (Apaf-1) und pLexA/WD-40 (Apaf-1)	Kodierende Region (kodierend für Aminosäure 1-1237) des Apaf-1-Gens (<i>H. sapiens</i>)	Dr. D. Huang, WEHI, Melbourne, Australien ^a
pEF-SEM	Ausgangsvektor für die Klonierung des Expressionsplasmids pEF-SEM/hRPB11; Amp ^r , EF-1 α -Promoter (1185Bp)		Dr. H. Häcker, Technische Universität München ^a

^a Plasmid/Vektor wurde zur Verfügung gestellt

^b Plasmid ist in dieser Publikation beschrieben

4. 1. 4. 3 Plasmide für Reporter-Assays

4. 1. 4. 3. 1 Reporterplasmide

Alle Reporterplasmide enthalten die codierende Region des Glühwürmchen-Luciferasegens (Luc) als Reportergen für die Promoteraktivität.

Name	Backbone	Promoter	Referenz
E-Cad-Luc	pGL2-Basic: Luciferasegen luc (1649 Bp), Amp ^r	Menschlicher E-Cadherin-Promoter (1484 Bp)	Dr. K. M. Hajra, University of Michigan, MI, USA ^a
β -Actin-Luc	pGL3-Basic: Luciferasegen luc+ (1649 Bp), Amp ^r	Menschlicher β -Actin-Promoter (4300 Bp)	Dr. R. M. Vabulas, Technische Universität München ^a

CMV-Luc	pGL3-Basic	CMV-Promoter (700 Bp)	Dr. R. M. Vabulas, Technische Universität München ^a
MHC-I-Luc	pGL3-Basic	MHC-I-Promoter (2000 Bp)	Dr. R. M. Vabulas, Technische Universität München ^a
Hsp-70-Luc	pGL3-Basic	Hsp-70-Promoter	Dr. R. M. Vabulas, Technische Universität München ^a
WNT-Luc	pGL3-Basic	WNT-Promoter	Dr. R. M. Vabulas, Technische Universität München ^a
IL-2-Luc	pGL3-Basic	IL-2-Promoter	Dr. H. Häcker, Technische Universität München ^a
IL-8-Luc	pGL3-Basic	IL-8-Promoter	Dr. H. Häcker, Technische Universität München ^a
AP-1-Luc	pGL3-Basic	AP-1-Promoter	Dr. H. Häcker, Technische Universität München ^a
IgH-Luc	pGL3-Basic	Igκ-Promoter	Dr. H. Häcker, Technische Universität München ^a
ELAM-Luc	pGL2-Basic	ELAM-Promoter (782 Bp)	Dr. C. Kirschner, Technische Universität München ^a

^a Plasmid wurde zur Verfügung gestellt

4. 1. 4. 3. 2 Expressionsplasmide

In diesen Konstrukten steht die Expression des jeweiligen Proteins unter der Kontrolle des in Säugetierzellen konstitutiv aktiven Elongationsfaktor (EF)-Promoters (Modifikationen des Vektors pEF-BOS [Mizushima and Nagata, *Nucleic Acids Res.* 1990]) bzw. des Cytomegalovirus (CMV)-Promoters.

Plasmid	Exprimiertes Protein	Referenz
pEF/p35	Vollständiges P35-Protein (<i>A. californica</i>)	Eigene Herstellung
pEF/p35FLAG	Ac-P35/FLAG-Fusionsprotein (FLAG-Tag ist C-terminal)	Eigene Herstellung
pEF-SEM/ hRPB11	Protein der RNA-Polymerase II-Untereinheit 11 (<i>H. sapiens</i>)	Eigene Herstellung
pCMV/hRPB11-GFP	Protein der RNA-Polymerase II-Untereinheit 11 (<i>H. sapiens</i>), fusioniert mit Green Fluorescent Protein (GFP)	Dr. M. Vigneron, Louis Pasteur-Universität, Illkirch, Frankreich ^a
pEF/bcl-2	Bcl-2-Protein (<i>H. sapiens</i>)	Dr. David Huang/Dr. Jerry Adams, WEHI, Melbourne, Australien ^a

^a Plasmid wurde zur Verfügung gestellt

4. 1. 5 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Alle Primer wurden in lyophilisiertem Zustand von der Firma Metabion, Martinsried, bezogen und durch Auffüllen mit H₂O bidest auf eine Endkonzentration von 50 pmol/μl gebracht.

Name	Sequenz (5'→ 3')	Verwendung
YES-S	GATGTTAACGATAC CAGC C	pYESTrp-spezifischer Forward-Primer zur PCR-Amplifikation von Interaktor-cDNA aus blauen Hefekolonien im Zuge des Interaction Trap sowie für die Sequenzierung der ermittelten Interaktoren (Abschnitt 4. 2. 2. 1. 2, Punkt 7 u. 8)
YES-AS	GCTCTAGAGCGTGA ATGTAAGCGTGAC	pYESTrp-spezifischer Reverse-Primer zur PCR-Amplifikation von Interaktor-cDNA aus blauen Hefekolonien im Zuge des Interaction Trap (Abschnitt 4. 2. 2. 1. 2, Punkt 7)
YES-SEco	CCGGAATTCGATGT TAACGATACCAGCC	pYESTrp-spezifische Primer zur PCR-Amplifikation von Interaktor-cDNA aus blauen Hefeklonen im Zuge des Interaction Trap für die Klonierung in pJG4-5
YES-ASXho	AACCGCTCGAGTCA ATTAGGGCGTGAAT GTAAGCGTG	
p35CJGS	GGAATTCATGTGTG TAATTTTCCGG	PCR-Amplifikation des N-Terminus von Ac-p35 aus pBlueskript/p35 für die Klonierung in pLexA202 und pJG4-5
257RI	GGAATTCTGCAGTT AGTCGTTGCGTTCTG TCG	
Apaf CARD 5'	GGAATTCATGGATG CAAAAGCTCGA	PCR-Amplifikation der CARD-Domäne von Apaf-1 (<i>H. sapiens</i>) aus pcDNA3/Apaf-1 für die Klonierung in pLexA202
Apaf CARD 3'	CGGGATCCTCAATC ATGGAGAAGGGCAG	
Apaf WD-40 5'	CGGGATCCGGAATT TTCAGGAGTT TTTA	PCR-Amplifikation der WD-40-Domäne von Apaf-1 (<i>H. sapiens</i>) aus pcDNA3/Apaf-1 für die Klonierung in pLexA202
Apaf WD-40 3'	CCGCTCGAGTTATTC TAAAGTCTGTAAAA TATA	
hRPB11-SLex	CCGGAATTCATGAA CGCCCCTCCA GCC	PCR-Amplifikation von hRPB11 aus pYESTrp/hRPB11 (k95.1) für die Klonierung in pLexA202 und zur Identifizierung von K96.11 und K194.11 aus Screen-Nr. 5 _{12,1} (siehe Abschnitt 2. 1. 1)
hRPB11-AS	CCGGAATTCCTCTG GCCCCTACTC AAT	

4. 1. 6 Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Autoklav	S-ECZ	Wolf Sanoclav, Geislingen
Blotkammer	Mini Trans-Blot® Cell	Biorad, Hercules, CA, USA
Brutschränke:		
Hefen und Bakterien Zellen	WB 300 BB 6220	Mytron, Heiligenstadt Heraeus, Hanau
DNA-Sequenzierautomat	373 DNA Sequencer Stretch	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Elektrophoresekammern:		
Agarose-Gele	Max Submarine Unit HE99X	Hoefer, San Francisco, CA, USA
SDS-PAGE-Gele	Mighty Small SE260 Mini-vertical Unit	Hoefer, San Francisco, CA, USA
Elektroporationsapparat	Gene Pulser™	Biorad, Hercules, CA, USA
Luminometer	Lumat LB9507	EG&G Berthold, Bad Wildbad
Lichtmikroskope	ID203, Axiovert 100	Zeiss, Jena
Konfokales Mikroskop	Axiovert 100 M Laser Scanning Microscope	Zeiss, Jena
PCR-Geräte	DNA Thermal Cycler UNO-Thermoblock TRIO-Thermoblock	Perkin Elmer, Norwalk, CT USA Biometra, Göttingen Biometra, Göttingen
Photometer	4054 Ultrospec Plus	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Spannungsquellen:		
Agarosegelelektrophorese	PS500XT DC Power Supply	Hoefer, San Francisco, CA, USA
SDS-PAGE-Gelelektrophorese	EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Sterilwerkbank	HERAsafe HSP 18	Heraeus, Hanau
UV-Transluminator	Eagle Eye™ II - Still Video System	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Zentrifugen:		
Mikrozentrifuge	Biofuge 13, 15R	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifugen	Omnifuge 2.ORS Sorvall RC 26 Plus	Heraeus, Hanau Du Pont, Newton, CT, USA

4. 1. 7 Sonstige Materialien

Kits zur DNA-Aufreinigung: QIAGEN Plasmid Midi, Maxi Kit QIAprep Spin Miniprep Kit QIAEX II Gel Extraction Kit QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden QIAGEN, Hilden QIAGEN, Hilden QIAGEN, Hilden
Sonstige Kits: DNA Ligation Kit DNA-Sequenzierungs-Kit: ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Luciferase Assay System	Takara Biochemicals, Berkeley, CA, USA Applied Biosystems, Foster City, CA, USA Promega, Madison, WI, USA
Molekulargewichtsmarker: DNA-Marker: 100 Bp DNA Ladder 1 kBp DNA Extension Ladder Protein-Marker: Seebue™ Pre-Stained Standards	Gibco BRL, Rockville, MD, USA Gibco BRL, Rockville, MD, USA Novex, San Diego, CA, USA
Western-Blot: Hyperfilm™ ECL™ Chemiluminescence Film Protran® BA 85 Nitrocellulose Transfer Membran Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus Whatman Papier	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden Schleicher & Schüll, Dassel NEN, Boston, MA, USA Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturartikel: Falcon® Zellkulturschalen Integrid™ 150 x 25 mm Falcon® Zellkulturschalen 100 x 20 mm Falcon® Zellkulturplatten Multiwell™, 6- Well und 12-Well Neubauer Zählkammer	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Merck, Darmstadt
Sonstige Materialien: Gene Pulser® Elektroporationsküvetten, 0,4 cm Elektrodenabstand EQUIBIO Elektroporationsküvetten, 0,2 cm Elektrodenabstand	Biorad, Hercules, CA, USA PEQLAB, Erlangen

4. 1. 8 Lösungen, Stammlösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit H₂O bidest angesetzt. Wenn ein anderes Lösungsmittel als Wasser verwendet wurde, ist dies entsprechend vermerkt. Ebenso wird darauf hingewiesen, wenn Lösungen zusätzlich sterilfiltriert oder autoklaviert wurden.

Puffer, die in gebrauchsfertigem Zustand, als Trockenmischung oder als Stammlösung von den entsprechenden Firmen bezogen wurden, sind unter Punkt 4. 1. 1 aufgelistet.

Agarosegelelektrophorese 6x Probenpuffer (DNA) 50x TAE	40 % (w/v) Saccharose, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 2 M Tris, 1 M Eisessig, 0,05 M EDTA (pH 8,0)
DNA-Sequenzierung EDTA/Dextranblau-Lösung 10 x TBE (angesetzt mit LiChrosolv [®] -Wasser)	25 mM EDTA (pH 8,0), 5 % (w/v) Dextranblau 892,5 mM Tris, 889,5 mM Borsäure, 25 mM EDTA
PCR 10 x PCR-Puffer dNTP-PCR-Mix	100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 0,1 % (w/v) Gelatine 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM GTP, 1 mM dTTP (hergestellt aus je 100 mM-Stammlösung der Firma Roche)
Western-Blot Ammoniumpersulfatlösung Blockierlösung 5x Laufpuffer 4x Probenpuffer SDS-Stammlösung 2x Transferpuffer 1,5 M Tris-HCl Waschpuffer	10 % (w/v) APS 5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,1 % (v/v) Tween 20 125 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,25 M Glycin, 0,5 % (w/v) SDS 200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 400 mM DTT, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0,1 % (w/v) Bromphenol- blau 10 % (w/v) SDS 96 mM Tris-HCl (pH 8,0), 78 mM Glycin, 0,074 % (w/v) SDS 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 65 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20
Interaction Trap-System <i>Medien:</i> Aminosäure-Dropout-Mix	0,083 % L-Adenin, 0,04 % L-Arginin, 0,2 % L-Aspartat, 0,2 % L-Glutamat, 0,06 % L-Lysin, 0,04 % L-Methionin, 0,1 % L-Phenylalanin, 0,75 % L-Serin 0,4 % L-Threonin, 0,06 % L-Tyrosin, 0,3 % L-Valin (alle AS w/v), sterilfiltriert

10 x BU-Salze (0,7 M)	300 mM NaH ₂ PO ₄ , 400 mM Na ₂ HPO ₄ , autoklaviert (1 bar, 121°C, 20 min.)
Histidin- Stammlösung	0,24 % (w/v) L-Histidin, sterilfiltriert
Leucin- Stammlösung	0,72 % (w/v) L-Leucin, sterilfiltriert
Tryptophan- Stammlösung	0,48 % (w/v) L-Tryptophan, sterilfiltriert
Uracil- Stammlösung	0,24 % (w/v) Uracil, sterilfiltriert
Galactose-Stammlösung	1 M D-Galactose, sterilfiltriert
Glucose-Stammlösung	1 M D-Glucose, sterilfiltriert
Kanamycin-Stammlösung	
Vancomycin-Stammlösung	
X-Gal-Stammlösung	4 % (w/v) X-Gal (in DMF), sterilfiltriert
<i>Sonstiges:</i>	
Cracking Puffer	8 M Harnstoff, 5 % (w/v) SDS, 40 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 mM EDTA, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
Glycerollösung	65 % (v/v) Glycerol, 0,1 M MgSO ₄ , 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), autoklaviert (1 bar, 121°C, 20 min.)
Hefe-Lysepuffer	2,5 M LiCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 4 % (v/v) Triton X-100, 62,5 mM EDTA
10x LiAc	1 M Li-Acetat, pH 7,5, sterilfiltriert
1x LiAc/ 40 % PEG-3350/ 1x TE	100 mM Li-Acetat (pH 7,5), 40 % (w/v) PEG-3350, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), autoklaviert (1 bar, 121°C, 20 min.)
10x TE	100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 7,5), sterilfiltriert
Sonstige Lösungen	
<i>Kompetente Bakterien:</i>	
1 x TSS	10 % (w/v) PEG-4000, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl (pH 6,5), in LB, sterilfiltriert
Glycerol, 10 %ig	10 % (v/v) Glycerol
Ampicillin-Stammlösung	5 % (w/v) Ampicillin, sterilfiltriert
Ethanol, 70 %ig	70 % (v/v) Ethanol
Na-Acetat-Lösung	3 M Na-Acetat, pH 4,8
<i>Plasmidpräparationen</i>	
<i>(Minipräparationen):</i>	
Lösung I	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0),
Lösung II	0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS, frisch hergestellt
Lösung III	3 M K-Acetat, 11,5 % (v/v) Eisessig
<i>Transformation von E. coli:</i>	
5x KCM-Puffer	0,15 M CaCl ₂ , 0,25 M MgCl ₂ , 0,5 M KCl

4.1.9 Medien

4.1.9.1 Medien für die Bakterienkultur

LB-(Luria-Bertani)-Medium:

1 % (w/v) Bacto-Trypton
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 1 % (w/v) NaCl, pH 7,2
 autoklaviert (1 bar, 121°C, 20 min.)

SOC-Medium:

2 % (w/v) Trypton
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 8,5 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂, pH 7,0
 autoklaviert (1 bar, 121°C, 20 min.), auf
 <55°C abgekühlt
 2 % (v/v) 1 M Glucoselösung

Für die Herstellung fester LB-Nährmedien wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Zur positiven Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Medium Ampicillin hinzugefügt. Die Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration: 100 mg/l) erfolgte nach Abkühlen auf <55°C.

4.1.9.2 Medien für die Hefekultur (*S. cerevisiae* EGY 48)

Grundmedium:

0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o AS
 5 % (v/v) Aminosäure-Dropout-Mix
 autoklaviert (1 bar, 121°C, 20 min.), auf <55°C abgekühlt
 10 % 1 M Glucose/Galactoselösung

Selektivmedien:

Für die Herstellung der verschiedenen Selektivmedien wurden zu dem Grundmedium je 0,83 % (v/v) der Histidin-, Leucin-, Tryptophan- und Uracil-Stammlösungen in unterschiedlichen Kombinationen hinzugefügt

Folgende Selektivmedien wurden verwendet:

Medium	Leucin-Supplement	Histidin-Supplement	Tryptophan-Supplement	Uracil-Supplement	X-Gal-Supplement
*U ⁻	+	+	+	-	-
*UH ⁻	+	-	+	-	-
*UHW ⁻	+	-	-	-	-
**UHWL ⁻	-	-	-	-	-
**UHWL ⁻ -X-Gal	-	-	-	-	+
*UHL ⁻	-	-	+	-	-
**W ⁻	+	+	-	+	-

*Im Grundmedium 10 % (v/v) 1 M Glucoselösung

**Im Grundmedium 10 % (v/v) 1 M Galactoselösung

Für die Herstellung fester Medien wurde vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Bacto-Agar sowie 0,01 % (w/v) NaOH zugesetzt.

Für die Herstellung der β -Galactosidase-Indikatorplatten wurden zu dem Grundmedium 10 % (v/v) 0,7 M 10 x BU-Salzlösung sowie 0,2 % (v/v) X-Gal-Stammlösung hinzugefügt.

Zu allen Medien wurden als bakterienhemmende Wirkstoffe Kanamycin (Wirkungskonzentration: 70 μ g/ml und Vancomycin (Wirkungskonzentration: 6 μ g/ml) zugegeben.

4. 1. 9. 3 Medien für die Zellkultur

Click's RPMI 1640

Trockenmedium Click/RPMI 1640 (1:1, w L-Glutamin, w/o NaHCO₃) der Firma Biochrom, supplementiert mit:

1,175 g/l NaHCO₃

2,383 g /l HEPES

10 % (v/v) FKS

1 % L-Glutamin

1 % Penicillin/ Streptomycin-Lösung

pH 7,2

DMEM

Trockenmedium Dulbecco's MEM (w D-Glucose, w L-Glutamin, w/o NaHCO₃, w/o Na-Pyruvat) der Firma Biochrom, supplementiert mit:

3,7 g/l NaHCO₃

10 % (v/v) FKS

1 % L-Glutamin

1 % Penicillin/ Streptomycin-Lösung

pH 7,2

RPMI 1640

Flüssigmedium RPMI 1640 (mit GlutaMAX-ITM) der Firma Gibco, supplementiert mit:

10 % (v/v) FKS

1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung

pH 7,1

FKS wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren vor Gebrauch 30 Minuten auf 56 °C erhitzt.

Alle Medien wurden sterilfiltriert.

4. 1. 10 Mikroorganismen und Zelllinien

4. 1. 10. 1 Bakterien

Für sämtliche Arbeiten zur Amplifikation von Plasmidvektoren wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α verwendet.

Genotyp: supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

Referenz: Sambrook and Russel, 2001

4. 1. 10. 2 Hefen

Für die Durchführung des Interaction Trap-Systems wurden die Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48/pSH18-34 (Invitrogen) und *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48/pJK103 (zur Verfügung gestellt von M. Rietzler, AG Prof. Holzmann, Technische Universität München) verwendet. Beide Hefestämme leiten sich aus dem Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48 (Estojak et al., *Mol Cell Biol* 1995) her, der mit dem Reporterplasmid pSH18-34 bzw. pJK103 transformiert wurde.

Genotyp: MAT α ura3 trp1 his3 6lexAop-LEU2
URA3:: (8lexAop-lacZ) [bei *S. cerevisiae* EGY 48/pJK103: 2 lexAop-lacZ]

Phenotyp: Trp-, His-, Leu-

Referenz: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (Catalog 2001 und Manual *Hybrid Hunter*TM, Version A)

Infolge der genomischen Mutationen ist der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48 in Bezug auf die Aminosäuren Tryptophan, Histidin und Leucin sowie auf die Pyrimidinbase Uracil auxotroph, d.h. er ist für das Wachstum auf die Zuführung dieser Komponenten von außen angewiesen. Da die verwendeten Hefestämme bereits die Reporterplasmide pSH18-34 bzw. pJK103 integriert haben, die jeweils das Gen *URA3* für die Uracilsynthese enthalten, ist die Uracil-Auxotrophie jedoch aufgehoben. Die Defizienz für die Synthese der Aminosäuren Tryptophan und Histidin kann durch die entsprechenden plasmid-kodierten Gene (*TRP1* und *HIS3*) revertiert werden und ermöglicht dadurch die Selektion auf den Erhalt dieser Plasmide bei Wachstum auf Medien mit entsprechendem Aminosäuremangel. Die Auxotrophie bezüglich der

Aminosäure Leucin kann nur nach Bindung des Transkriptionsfaktors LexA/B42 an die LexA-Operatorsequenzen vor dem *LEU2*-Gen aufgehoben werden. Das LacZ-Gen der Reporterplasmide hingegen ermöglicht eine Selektion von Hefeklonen aufgrund ihrer Blaufärbung (siehe Abschnitt 4. 2. 1. 13. 1).

Folgende Selektivmedien wurden eingesetzt (vgl. Abschnitt 4. 1. 9. 2), um einen Selektionsdruck zu erzielen:

Selektivmedium	Selektionsziel
U ⁻	pSH18-34
UH ⁻	pSH18-34 + LexA-Bait-Plasmid
UHW ⁻	pSH18-34 + LexA-Bait-Plasmid + pYESTrp
UHWL ⁻	pSH18-34 + LexA-Bait-Plasmid + pYESTrp + <i>LEU2</i> -Genaktivität
UHWL ⁻ -X-Gal	pSH18-34 + LexA-Bait-Plasmid + pYESTrp + <i>LEU2</i> -Genaktivität + LacZ-Genaktivität
UHL ⁻	pSH18-34 + LexA-Bait-Plasmid + <i>LEU2</i> -Genaktivität
UHL ⁻ -X-Gal	pSH18-34 + LexA-Bait-Plasmid + <i>LEU2</i> -Genaktivität + LacZ-Genaktivität
W ⁻	pYESTrp

Die Selektionsmedien enthielten alle erforderlichen Wachstumskomponenten außer den jeweils angegebenen (U, Uracil, H, Histidin, W, Tryptophan, L, Leucin)

Der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48/pJK103/pLexA/Integrin β_7 wurde von M. Rietzler (AG Prof. B. Holzmann, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt.

Dieser Hefestamm leitet sich aus dem Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48 her, in den das Reporterplasmid pJK103 sowie das Bait-Plasmid pLexA/Integrin β_7 transformiert wurde (siehe Rietzler et al., *J Biol Chem* 1998). *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48/pJK103/pLexA/Integrin β_7 wurde bei der Durchführung des Interaction Trap als Kontrolle verwendet (Abschnitt 4. 2. 2. 1. 2, Punkt 7).

4. 1. 10. 3 Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Zelllinie	Zelltyp	Ursprung	Referenz
LoVo	Humanes Kolon-Adenokarzinom	Etabliert im Jahre 1972 aus einem metastasierenden, humanen Dickdarm-Adenokarzinom eines männlichen Patienten	Bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
293-T	Transformierte menschliche Nierenfibroblasten		Bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC)
Jurkat	Humane T-Zell Leukämie	Etabliert im Jahre 1976 aus dem peripheren Blut eines Jugendlichen mit akuter lymphoblastischer Leukämie	Bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
HeLa	Humanes Zervixkarzinom	Etabliert im Jahre 1951 aus Zellen des Gebärmutterhalskarzinoms einer Patientin	Bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in folgenden Medien (vgl. Abschnitt 4. 1. 9. 3):

Zelllinie	Medium
LoVo	RPMI 1640
293-T	DMEM
Jurkat	Click'sRPMI 1640
HeLa	DMEM

4. 2 Methoden

4. 2. 1 Molekularbiologische und biochemische Standardmethoden

4. 2. 1. 1 Fällen und Reinigung von DNA

Zur Entsalzung und/oder Konzentrierung von Nucleinsäurelösungen wurde die DNA mit reinem Ethanol gefällt. Dazu wurden der Probelösung das 2,5fache Volumen Ethanol und 1/10 des Probevolumens an 3 M Na-Acetatlösung zugegeben und die DNA bei Raumtemperatur für 20-30 min gefällt. Nach Zentrifugation (12000 g, 20 min) wurde das Pellet zur Entfernung von Salzen mit 70 %igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und bei 37°C luftgetrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in H₂O bidest gelöst und bei –20°C aufbewahrt.

Um Nucleinsäurelösungen von unerwünschten Stoffen wie Proteinen und Lipiden zu befreien, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dabei wurde die Probelösung mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform-Lösung versetzt, durch Vortexen durchmischt und 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde unter Vermeidung der Interphase in ein neues Gefäß überführt und mit einem gleichen Volumen Chloroform erneut extrahiert. Die wässrige Phase wurde anschließend einer Ethanol-fällung unterworfen.

Eine andere Möglichkeit der DNA-Reinigung bestand im Einsatz von Silicagel-Säulchen zur Adsorption der DNA bei hohen Salzkonzentrationen. Nach der Adsorption und einem Wasch-Schritt wurde die DNA mit H₂O bidest von der Säule eluiert. Zur DNA-Reinigung nach dieser Methode wurde das *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen verwendet, wobei mit den Reagenzien und Materialien des Herstellers und nach seinen Vorschriften gearbeitet wurde.

Um DNA aus Agarosegelen anzureinigen wurde die DNA-Bande im UV-Licht mit einem Scalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten, in einem Hochsalzpuffer gelöst und mit einer Silica-Suspension versetzt. Nach Adsorption an die Silica-Partikel sowie mehreren Waschschritten wurde die DNA mit H₂O bidest eluiert. Die Anreinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *QIAEX II Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen, wobei mit den Reagenzien und Materialien des Herstellers und nach seinen Vorschriften gearbeitet wurde.

4. 2. 1. 2 Präparation von DNA

4. 2. 1. 2. 1 Präparation im kleinen Maßstab (Minipräparationen)

Die Minipräparation von DNA nach der Methode der alkalischen Lyse erfolgte nach den Vorschriften aus Sambrook and Russel, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Sambrook and Russel, *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 2001) und stellt eine modifizierte Version der Methode von *Birnboim and Doly* (Birnboim and Doly, *Nucl. Acids Res* 1979) dar. Bei dieser Methode der alkalischen Lyse wird die DNA bei stark alkalischem pH denaturiert. Nach der Neutralisation mit Essigsäure hybridisieren die beiden Stränge der Plasmid-DNA rasch wieder, während die weit größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt (Mülhardt, *Spektrum Akad Verlag* 2000).

Um Plasmid-DNA, die zuvor in Bakterien transformiert worden ist zu isolieren und zu reinigen, muss sie zunächst in einer Übernachtskultur amplifiziert werden. Zur Amplifikation der DNA wurden 2 ml Ampicillin-enthaltendes LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit je einer Kolonie der transformierten Bakterien (siehe Punkt 4. 2. 1. 4) beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den Übernachtskulturen wurden jeweils 1,5 ml entnommen und zentrifugiert (12000 g, 1 min), und das Bakterienpellet wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II hinzugegeben, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert, bis die Bakterien lysiert waren. Dann wurden 150 µl Lösung III zur Neutralisation hinzugegeben, und die Lösung wurde bei 12000g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung unterworfen. Die Ethanolfällung wurde mit dem 2fachen Volumen Ethanol und ohne Zugabe von Na-Acetat vorgenommen (vgl. Punkt 4. 2. 1. 1.) Das trockene DNA-Pellet wurde in 50 µl TE Puffer, dass 10 mg/ml DNase-freie RNase A enthielt, gelöst und die Lösung wurde bei –20°C aufbewahrt.

Eine weitaus schnellere Methode der Minipräparation bot der Einsatz von Silicagel-Säulchen. Hier wurden die Bakterien ebenfalls unter alkalischen Bedingungen lysiert und die chromosomale DNA von der Plasmid-DNA getrennt. Zur Abtrennung von Proteinen, RNA und Meta-boliten wurde die Plasmid-DNA selektiv und unter hohen Salzkonzentrationen an eine Silicagel-Membran gebunden. Nach einem Wasch-Schritt wurde sie mit H₂O bidest von dem Silicagel-Säulchen eluiert. Zur DNA-Präparation nach dieser Methode wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen verwendet, wobei mit den Reagenzien und Materialien des

Herstellers und nach seinen Vorschriften gearbeitet wurde.

Im Zuge der Klonierung von DNA-Fragmenten (siehe Abschnitt 4. 2. 1. 12) wurden Minipräparationen zum Zwecke des analytischen Restriktionsverdaus, d. h. zur Überprüfung der Anwesenheit bzw. richtigen Orientierung eines DNA-Fragments nach Ligation in einen Klonierungsvektor durchgeführt. Dazu wurden typischerweise nach Transformation des Ligationsproduktes 8-12 Minipräparationen gemacht und die gereinigte DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Aus einem Teil der Übernachtskultur desjenigen Minipreps, welches das korrekt ligierte Produkt enthielt, wurde wiederum eine Übernachtskultur für eine Midi-oder Maxipräparation (siehe Abschnitt 4. 2. 1. 2. 1) des Ligationsproduktes angesetzt. Auf diese Weise stand ein fertig ligiertes Produkt in ausreichend hoher Menge und Reinheit für eine Vielzahl weiterer Experimente zur Verfügung.

4. 2. 1. 2. 2 Präparation im großen Maßstab (Midi- oder Maxipräparationen)

Hier wurde Plasmid-DNA, die in 30 ml (Midipräparation) oder 100 ml (Maxipräparation) Bakterien-Übernachtskultur amplifiziert worden war, nach dem gleichen Prinzip wie bei den Minipräparationen gewonnen. Zur Reinigung wurden jedoch Anionenaustauschersäulen verwendet, wobei die negativ geladene Plasmid-DNA an die positiv geladenen DEAE-Gruppen des Anionenaustauschers gebunden wurde. Verunreinigungen wie RNA, Proteine oder Kohlenhydrate wurden mit einem Puffer mittelstarker Salzkonzentration von der Säule gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit einem Hochsalzpuffer eluiert. Anschließend erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA mit Isopropanol. Zum Schluss wurde das getrocknete, durch Waschen mit 70 %igem Ethanol von Salzen befreite DNA-Pellet in einem Volumen von 400-500 µl H₂O bidest aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

Zur DNA-Präparation nach dieser Methode wurde das *QIAGEN Plasmid Midi Kit* bzw. *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen verwendet, wobei mit den Reagenzien und Materialien des Herstellers und nach seinen Vorschriften gearbeitet wurde.

4. 2. 1. 3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) der gereinigten DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum). Dazu wurde die DNA-Lösung um einen definierten Faktor mit H₂O bidest verdünnt, in eine Quarzküvette überführt, und die Extinktion dieser Lösung wurde im Photometer gegen H₂O bidest gemessen. Aus dem Verhältnis der OD_{260 nm} und der OD_{280 nm} konnte außerdem eine Aussage über die Proteinkontamination in der Lösung erhalten werden (eine proteinfreie Nucleinsäurelösung weist typischerweise ein Verhältnis von 1,8-2,0 auf). Die Konzentration von Nucleinsäurelösungen errechnet sich nach:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \cdot V \cdot F$$

wobei:

c = Konzentration der DNA, V = Verdünnungsfaktor, F = Multiplikationsfaktor ($F = 50$ für doppelsträngige DNA)

4. 2. 1. 4 Transformation von Bakterien

Um Plasmid-DNA zu amplifizieren wird sie zuvor in Bakterien eingeschleust.

Das Prinzip des Transformierens besteht darin, dass *E. coli*-Zellen hohen Konzentrationen bestimmter zweiwertiger Kationen ausgesetzt werden, so dass ein kleiner Anteil von ihnen für fremde DNA durchlässig wird (Lodish, *Molekulare Zellbiologie*, deGruyter 1996).

Das eingeführte Plasmid trägt typischerweise ein Resistenzgen wie z. B. das Ampicillin-resistenzgen, welches für das Enzym β -Lactamase kodiert, das das Antibiotikum Ampicillin inaktiviert. Durch das Wachstum auf Antibiotikum-haltigem LB-Festmedium bei 37°C können nach Inkubation der *E. coli*-Zellen mit Plasmidvektoren diejenigen Zellen selektioniert werden, die das Plasmid aufgenommen haben, da nur sie aufgrund des aufgenommenen Antibiotikum-Resistenzgens überleben und wachsen können.

Bei der Transformation des verwendeten Bakterienstammes *E. coli* DH5 α mit Plasmid-DNA wurden zu 100 μ l kompetenter Bakterien 100 μ l der Plasmid-DNA-Lösung gegeben und für

25 min auf Eis gestellt. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde hergestellt, indem zu 20 µl 5x KCM-Puffer 0,1-0,5 ng Plasmid-DNA bzw. 5-10 µl Ligationslösung hinzugegeben und mit H₂O bidest auf 100 µl aufgefüllt wurde. Nach Inkubation auf Eis wurde die Bakterien/DNA-Suspension auf 42°C für 90 s gehalten (Hitzeschock), auf Eis kurz abgekühlt, mit 800 µl LB-Medium versetzt und für 30 min auf 37°C gehalten. Anschließend wurden 0,5-1 ml (bei Ligationen) bzw. 0,1-0,2 ml (für Plasmid-Präparationen) der Bakteriensuspension auf eine LB-Agar-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide waren mit dem Resistenzgen Amp^r [das für eine β-Lactamase kodiert] ausgestattet).

Eine andere benutzte Methode der Transformation von Bakterienzellen, die Elektroporation, wurde für die Amplifikation des Prey-Plasmids pYESTrp bei der Isolierung von Interaktionspartnern im Interaction Trap-System (siehe Abschnitt 4. 2. 2. 1. 2, Punkt 7) eingesetzt. Bei diesem Verfahren werden die Zellen nach einem kurzen elektrischen Schock von einigen tausend Volt vorübergehend für DNA durchlässig. Dabei entstehen wahrscheinlich kurzzeitig Löcher in der Zellmembran, durch die die DNA in die Zellen gelangen kann, bevor sich die Löcher wieder schließen (Lodish, *Molekulare Zellbiologie*, 1996). Mit Hilfe der Elektroporation kann eine wesentlich höhere Transformationseffizienz erzielt werden als mit chemischen Methoden. Während man sich bei der chemischen Transformation von Bakterien in einem Bereich von 10⁶-10⁸ Kolonien je µg Test-DNA befindet, kann man mittels Elektroporation eine Effizienz von 10⁹-10¹⁰ Transformanten pro µg Test-DNA erreichen (Mülhardt, *Molekularbiologie*, Spektrum Verlag 2000).

Zur Elektroporation von *E. coli* DH5α wurden 40 µl eisgekühlte und für die Elektroporation kompetente Bakterien mit 1 µl der nach Abschnitt 4. 2. 2. 1. 2, Punkt 7 gewonnenen Plasmidpräparation versetzt und in eine eisgekühlte Küvette (2 mm Elektrodenabstand) überführt. Mit Hilfe des Elektroporationsgerätes wurde an die Elektroden der Küvette ein Spannungsimpuls von 2,5 Kilovolt angelegt. Der Spannungsimpuls wurde dabei von einem Kondensator mit einer Kapazität von 25 Mikروفarad generiert. Durch die *Puls Controller*-Einheit des Gerätes wurde ein Widerstand von 200 Ohm eingestellt. Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml SOC-Medium auf die Bakterienzellen gegeben, vorsichtig durchmischt und die Suspension 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Suspension auf eine LB-Agar-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4. 2. 1. 4. 1 Herstellen kompetenter Bakterien

Um Bakterienzellen für die DNA-Aufnahme empfänglich zu machen, wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer *E. coli* DH5 α -Übernachtskultur beimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀, von 0,3-0,4 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde anschliessend bei 4°C 10-15 min zentrifugiert (1000 g), der Überstand verworfen und die Zellen in 50 ml eisgekühlter, frisch bereiteter 1x TSS-Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde aliquotiert (je 450 μ l), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die auf Eis aufgetauten Aliquots wurden für die Transformation (siehe Punkt 4. 2. 1. 4) eingesetzt.

Um Bakterien für die Elektroporation kompetent zu machen, wurde zunächst 1 L LB-Medium mit 10 ml einer *E. coli* DH5 α -Übernachtskultur beimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀, von 0,5-0,7 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde anschließend für 30 min auf Eis gestellt, danach bei 4°C und 4000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 Liter eisgekühlter 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert. Nach Zentrifugation (4°C, 4000 g, 15 min) der Bakteriensuspension und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 500 ml eisgekühlter 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (4°C, 4000 g, 15 min). Das Bakterienpellet wurde dann in 20 ml eisgekühlter 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und anschließend zentrifugiert (4°C, 4000 g, 15 min). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 3 ml eisgekühlter 10 %iger Glycerinlösung aufgenommen und zu je 200 μ l-Portionen aliquotiert. Auf einem Trockeneis/Ethanol-Bad wurden die Zellen schockgefroren und dann in einer Kühltruhe bei -70°C aufbewahrt. Die auf Eis aufgetauten Aliquots wurden für die Elektroporation (siehe Punkt 4. 2. 1. 4) eingesetzt.

4. 2. 1. 5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich elektrophoretisch in Agarosegelen auftrennen. Dazu wird eine Spannung an den Enden eines Agarosegels angelegt und auf diese Weise ein elektrisches Feld generiert, in dem die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung der Anode wandern. Die Migrationsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle wird durch den Reibungswiderstand der Agarosegelmatrix beeinflusst: größere Moleküle werden stärker gebremst als kleinere, so dass eine Auftrennung nach Größe erfolgt. Dabei gilt, dass die Migrationsgeschwindigkeit eines linearen DNA-Moleküls umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichtes

ist (Helling, 1974). Das Molekulargewicht eines DNA-Fragments wird mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers, in dem DNA-Fragmente definierter Größe enthalten sind, bestimmt. Dazu wird die Laufstrecke des DNA-Fragments mit den Laufstrecken der DNA-Moleküle des Molekulargewichtsmarkers verglichen.

Um DNA-Moleküle im Agarosegel detektieren zu können, wird dem Gel vor der Elektrophorese Ethidiumbromid zugesetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff schiebt sich zwischen die Basenpaare der DNA (Interkalation) und fluoresziert nach Bestrahlung mit UV-Licht (260-360 nm) im rot-orangen (560 nm) Spektralbereich (Lodish, *Molekulare Zellbiologie*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt, um DNA-Fragmente aufzutrennen, zu detektieren und durch Bestimmung ihres Molekulargewichtes zu identifizieren. Weiterhin wurde sie für die Anreinigung von DNA-Fragmenten eingesetzt, wobei die betreffenden Banden im UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen angereinigt wurden (siehe Abschnitt 4. 2. 1. 1)

Zur Herstellung der Gele wurden 2 g Agarose in 200 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf Handwärme mit 4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Gellösung wurde anschließend in eine Gelwanne gegossen, mit Gelkämmen versetzt und zum Auspolymerisieren belassen. Danach wurden die Kämmen entfernt und die Gelkammer mit dem erstarrten Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingesetzt. Nach Bedecken mit 1x TAE-Elektrophoresepuffer wurde das Agarosegel mit den DNA-Probelösungen sowie dem Molekulargewichtsmarker beladen. Die DNA-Probelösungen wurden zuvor mit 6x-Probenpuffer gemischt (5 Teile Probelösung + 1 Teil 6x-Probenpuffer) und in Volumina von 20-50 µl pro Geltasche appliziert. Der verwendete Molekulargewichtsmarker wurde mit 6x-Probenpuffer/H₂O auf eine Konzentration von 0,2 µg/µl eingestellt und in einer Menge von 1,0-1,5 µg auf das Agarosegel appliziert.

Mit der verwendeten Apparatur wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 150 V und einer maximal eingestellten Stromstärke von 400 mA durchgeführt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte im UV-Transluminator bei einer Wellenlänge von 266 nm. Das Bandenmuster konnte mit Hilfe des Gerätes und einer integrierten Software fotografiert und auf einer Computerdiskette gespeichert werden.

4. 2. 1. 6 DNA-Amplifikation mittels PCR

Bei der PCR (= Polymerase-Kettenreaktion) kann mittels eines Systems aufeinander folgender DNA-Synthesen ein DNA-Abschnitt, der ursprünglich nur in einer Kopie (oder in wenigen Kopien) vorliegt, millionenfach angereichert werden (Passarge, *Taschenatlas der Genetik*, Thieme 1994).

Dazu wird zunächst der zu amplifizierende (doppelsträngige) DNA-Abschnitt durch Denaturierung in Einzelstrang-DNA überführt. Im nächsten Schritt binden Oligonukleotide, die zu dem 5' bzw. 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, an die einzelsträngige DNA. Nach diesem Hybridisierungsschritt erfolgt die Synthese des Komplementärstranges, wobei die Desoxynucleosid-triphosphate von der DNA-Polymerase miteinander verknüpft werden. Diese Phase wird als Primerverlängerung oder Extension bezeichnet. Nach der Synthese des Komplementärstranges führt eine Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und Extension über mehrere Zyklen zur exponentiellen Anreicherung der gewünschten DNA-Sequenz.

Für die Mehrzahl der durchgeführten PCR-Reaktionen wurden die nachfolgend aufgeführten Parameter verwendet. Der Reaktionsansatz für die PCR war wie folgt:

Komponente	Menge
DNA-Template	10-100 ng
5'-Primer	1 µl (50 pmol)
3'-Primer	1 µl (50 pmol)
10x PCR-Puffer	5 µl
dNTP-Mix (1 mM)	10 µl
H ₂ O bidest	ad 50 µl

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert, gemischt und mit 50 µl Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet. Der Ansatz wurde dann in das PCR-Gerät gestellt. Für eine PCR-Reaktion wurden am Gerät folgende Einstellungen vorgenommen:

Schritt	Temperatur	Dauer
1. <i>Hot Start</i> : Denaturierung Abkühlung (hier wurden 1 µl Taq-DNA Polymerase bzw. 1 µl Pfu Turbo DNA Polymerase zum Reaktionsansatz gegeben)	94°C ¹ 80°C	3 min
2. Denaturierung	94°C	30 s
3. Hybridisierung	60°C ²	1 min
4. Extension	72°C	1 min ³
5. Eingabe der Anzahl Zyklen (Schritte 2-4): 35 Zyklen		

¹ 95°C bei einer Dauer von 5 min bei Amplifikation von Interaktoren in *E. coli* DH5α

² 50°C bei einer Dauer von 1 min bei PCR von β-Galactosidase-positiven Kolonien

³ Extensionszeiten wurden je nach Template-Größe gemäß der Beziehung 1000 Bp = 2,5 min berechnet

Nachdem die PCR-Reaktion abgeschlossen war, wurden die Proben zur Detektion der amplifizierten DNA-Fragmente einer Agarosegel-Elektrophorese (s. o.) unterworfen. Sollten die DNA-Fragmente zusätzlich angereinigt werden, so wurden sie mittels *QIAEX-II*-Extraktion aus dem Gel isoliert oder mit Ethanol (aus der PCR-Lösung) gefällt (s. o.).

4. 2. 1. 7 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifische palindromische Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNA. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen beider Stränge, wobei DNA-Moleküle mit definierten Enden entstehen, die sich zu Klonierungszwecken eignen.

Für analytische Restriktionsspaltungen wurden 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt, für Restriktionsspaltungen im Zuge von Klonierungsexperimenten waren es 2-5 µg Plasmid-DNA. Die dabei eingesetzten Enzymmengen betrugen in der Regel 5 Einheiten pro µg DNA. Für Restriktionsspaltungen von PCR-Produkten im Zuge von Klonierungsexperimenten wurden die PCR-Lösungen mit je 10-20 Einheiten Restriktionsenzym versetzt. Die Reaktionen erfolgten in den von den jeweiligen Herstellern mitgelieferten Puffern und wurden gemäß den angegebenen Bedingungen (z. B. Inkubationstemperatur und -dauer) durchgeführt. In allen Fällen wurde darauf geachtet, dass die Menge des eingesetzten Enzyms 10 % des Reaktionsvolumens nicht

überschritt, da zu hohe Glycerinmengen zu unspezifischer Enzymaktivität führen können.

Ein typischer Reaktionsansatz war wie folgt:

Komponente	Menge
DNA-Lösung	x µl (2 µg)
10x-Reaktionspuffer	4 µl
Restriktionsenzym	10 u
H ₂ O bidest	ad 40 µl

Inkubationstemperatur: 37°C

Inkubationsdauer: über Nacht

Nach dem Restriktionsverdau wurde der Ansatz entweder sofort weiterbehandelt (Aufreinigung, diagnostischer Verdau, Klenow-Behandlung usw.) oder bei –20°C für eine spätere Verwendung eingefroren.

In den Fällen, in denen die zu verdauende DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt werden musste, wurde zunächst mit einem der beiden Enzyme verdaut. Nach einer Phenol/Chloroform-Reinigung wurde die DNA anschließend mit dem zweiten Enzym gespalten. Der Aufreinigungsschritt konnte jedoch weggelassen werden, falls beide Enzyme in dem gleichen Reaktionspuffer eine ausreichend hohe Aktivität besaßen. In einem solchen Falle wurden beide Restriktionsenzyme (je 5 u/µg DNA) zu dem Reaktionsansatz gegeben.

4. 2. 1. 8 Klenow- und T4 DNA-Polymerase

Das Klenowfragment aus der *E. coli* DNA-Polymerase I und die Bakteriophagen T4 DNA-Polymerase sind sich sehr ähnlich: beide Enzyme besitzen die 5'→ 3'-Polymeraseaktivität sowie die 3'→ 5' Exonukleaseaktivität. Die Exonukleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase ist jedoch 200fach höher als die des Klenow-Fragments, weshalb man in der Laborpraxis Ersteres für die Generierung von glatten Enden bevorzugt.

Nach einem vollständigen Restriktionsverdau wurden zu dem Reaktionsansatz eine Einheit Enzym und 100 pmol Desoxynukleosid-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) hinzugefügt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der

Reaktion wurde die DNA einem Reinigungsschritt unterzogen (Abschnitt 4. 2. 1. 1) oder bei -20°C aufbewahrt.

4. 2. 1. 9 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation eines linearen Plasmidvektors mit kompatiblen Enden zu vermeiden und somit eine intermolekulare Ligation zwischen Vektor und DNA-Fragment zu begünstigen, wurden die 5'-Enden von Vektoren mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Nach einem Restriktionsverdau (und gegebenenfalls anschliessender Klenow- oder T4-DNA Polymerasenbehandlung) wurde dem gereinigten Reaktionsansatz eine Einheit alkalischer Phosphatase sowie 1/10 des Reaktionsvolumens 10x-Dephosphorylierungspuffer zugegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Um bei der folgenden Ligation störende Enzymaktivitäten zu vermeiden, wurde nach der Dephosphorylierung ein Reinigungsschritt durchgeführt (Abschnitt 4. 2. 1. 1).

4. 2. 1. 10 Ligation von DNA-Molekülen

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende von linearen DNA-Molekülen. Sie vermag sowohl überstehende als auch glatte Enden miteinander zu verknüpfen.

Für die intermolekulare Ligation wurden Vektor und Insert-DNA im molaren Verhältnis 1: 3 gemischt. Anschließend wurden 1 μl 10x-Ligationspuffer und eine Einheit T4 DNA-Ligase zugefügt und mit H_2O bidest auf ein Volumen von 10 μl aufgefüllt. Die Inkubation wurde bei 16°C über Nacht durchgeführt.

Statt der T4 DNA Polymerase wurde in zunehmendem Maße das *DNA Ligation Kit* der Firma Takara Biochemicals für die Durchführung von Ligationen verwendet. Hierbei wurde zu der Vektor/Insert-DNA-Lösung ein gleiches Volumen an Takara Solution I gegeben und der Ansatz bei 16°C für 30 min inkubiert. Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurde der Ansatz in *E. coli* DH5 α transformiert (Abschnitt 4. 2. 1. 4).

Bei allen durchgeführten Ligationen wurden jeweils gleichzeitig Kontroll-Reaktionen

durchgeführt, bei denen anstelle der Insert-DNA ein gleiches Volumen an H₂O bidest eingesetzt wurde. Auf diese Weise konnte eine Abschätzung über die Ligationsrate gemacht werden. Eine hohe Ligationsrate wurde erreicht, wenn nach der Transformation in *E. coli* die Anzahl der gewachsenen Kolonien auf der Ligationsplatte um den Faktor 3 höher war als auf der Kontroll- bzw. Religationsplatte.

4. 2. 1. 11 Klonieren von DNA-Fragmenten

Unter dem Begriff Klonieren wird in der Gentechnologie der Einbau einer DNA-Sequenz in einen Klonierungsvektor und dessen massenhafte Vermehrung in geeigneten Wirtszellen, z. B. Bakterien, verstanden (Lodish, *Molekulare Zellbiologie* 1996). In dieser Arbeit wurden die im Interaction Trap-System (Abschnitt 4. 2. 2. 1) verwendeten Bait- und Prey-Fusionsplasmide sowie die für die Promoterstudien (Abschnitt 4. 2. 2. 3) eingesetzten Expressionskonstrukte mit Hilfe der Klonierungstechnik erzeugt. Dazu wurden die zu klonierenden DNA-Fragmente mittels PCR bzw. mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus vorhandenen Plasmiden amplifiziert bzw. herausgeschnitten, gereinigt, in die entsprechenden Vektoren ligiert und in kompetente *E. coli* DH5 α -Bakterien transformiert. Die verwendeten Klonierungsvektoren waren mit dem Ampicillin-Resistenzgen ausgestattet, so dass nach der Transformation eine Selektion in Ampicillin-haltigem LB-Medium in der Weise erfolgte, dass sich nur diejenigen Bakterienzellen vermehren konnten, die das einklonierte DNA-Fragment aufgenommen hatten oder in denen der Klonierungsvektor zurückligierte, ohne das DNA-Fragment aufgenommen zu haben (unerwünscht, daher wird immer eine Vektorkontrolle mitgeführt, um die Anzahl Klone abschätzen zu können, in denen eine Selbstligation stattfand).

Als Beispiel einer Klonierung sei die in drei Schritten durchgeführte Subklonierung der Ac-P35-Sequenz in den Bait-Vektor pLexA202 zur Konstruktion des Bait-Fusionsplasmids pLexA/p35 beschrieben:

Klonierungsschritt I

1. Amplifikation des N-terminalen Anteils von Ac-p35 aus dem Plasmid pBlueskript/p35 mittels PCR, danach Agarosegel-Elektrophorese und Reinigung des aus dem Gel herausgeschnittenen PCR-Produktes mittels QIAEX-II-Extraktion.

2. Restriktionsverdau (BamHI, HindIII) des PCR-Produktes und Reinigung mittels Phenol/Chloroform-Extraktion.
3. Restriktionsverdau (BamHI, HindIII) des Vektors pGEM-7, danach Dephosphorylierung und Reinigung (Phenol/Chloroform-Extraktion).
4. Ligation des aus 2. erhaltenen PCR-Produktes in den geschnittenen Vektor pGEM-7 und Transformation in *E. coli* DH5 α . Nach Minipräparation und analytischem Restriktionsverdau Anreicherung des Ligationsproduktes mittels Maxipräparation.

Klonierungsschritt II

5. Ausschneiden des C-terminalen Anteils von Ac-p35 durch Restriktionsverdau (HindIII) aus dem Plasmid pBluescript/p35, danach Agarosegel-Elektrophorese und Reinigung des aus dem Gel herausgeschnittenen Inserts mittels QIAEX-II-Extraktion.
6. Restriktionsverdau (HindIII) des Plasmids pGEM-7/N-p35 (aus Schritt I, Punkt 4), danach Dephosphorylierung und Reinigung mit dem *QIAquick PCR Purification Kit*-Protokoll.
7. Ligation des aus Schritt II, Punkt 5 erhaltenen Inserts in pGEM-7/N-p35 (aus Schritt II, Punkt 6) und Transformation in *E. coli* DH5 α . Nach Minipräparation und analytischem Restriktionsverdau Anreicherung des Ligationsproduktes mittels Midipräparation.

Klonierungsschritt III

8. Herausschneiden der vollständigen p35-Sequenz aus dem aus Schritt II, Punkt 7 erhaltenen Ligationsproduktes pGEM-7/p35 mit dem Restriktionsenzym SacI, danach Behandlung mit T4 DNA Polymerase. Anschließend Agarosegel-Elektrophorese und Reinigung des Inserts mittels QIAEX-II-Extraktion.
9. Restriktionsverdau (EcoRI) des Bait-Vektors pLexA202, danach Behandlung mit T4 DNA Polymerase und Reinigung mit dem *QIAquick PCR Purification Kit*-Protokoll. Anschließend Dephosphorylierung und nochmalige Reinigung des Vektors mit dem *QIAquick PCR Purification Kit*-Protokoll.
10. Ligation des p35-Inserts aus Schritt III, Punkt 8 in pLexA202 (aus Schritt III, Punkt 9) und Transformation in *E. coli* DH5 α . Nach Minipräparation und analytischem Restriktionsverdau erfolgt die Anreicherung des Ligationsproduktes mittels Maxipräparation.

4. 2. 1. 12 Analyse von DNA-Sequenzen

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde nach der enzymatischen Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger, *Proc Natl Acad Sci USA* 1977) durchgeführt. Dazu wurde eine DNA Polymerase (AmpliTaq[®] DNA Polymerase, FS, im DNA-Sequenzierungs-Kit der Firma Applied Biosystems enthalten) benutzt, um den Komplementärstrang des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes herzustellen. Zur Synthese benutzt das Enzym Desoxynucleosid-triphosphate, die es an spezifische Primer anhängt. Da sich im Reaktionsansatz auch markierte 2',3'-Didesoxyanaloga befinden, nach deren Einbau die weitere DNA-Synthese stoppt, werden Fragmente verschiedenster Länge produziert, die alle an ihrem 3'-Ende das markierte Didesoxyanalogon besitzen. Durch die anschließende Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden die DNA-Moleküle aufgetrennt und je nach verwendeter Markierung sichtbar gemacht.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kit (ABI PRISM[™] Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, USA) wurde die Reaktion in Gegenwart von vier verschiedenen fluoreszenz-markierten Didesoxyanaloga durchgeführt. Der Einsatz der thermostabilen DNA-Polymerase AmpliTaq[®] DNA Polymerase, FS ermöglichte die Sequenzierreaktion nach der Cycle-Sequencing-Methode, die auf dem Prinzip der PCR beruht.

Der Reaktionsansatz für die Sequenzierreaktion wurde auf Eis zusammenpipettiert und hatte folgende Zusammensetzung:

Komponente	Menge
DNA-Template	1 µg
5'-Primer	1 µl (50 pmol)
Dye Terminator Mix	8 µl
H ₂ O bidest	ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde mit Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet und in den DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) gestellt. Am Gerät wurde ein fest eingestelltes Programm gewählt, womit für die Sequenzierungsreaktion 25 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil durchlaufen werden konnten:

96°C	4 min
96°C	30 s
50°C	15 s
60°C	4 min

Nach der Sequenzierreaktion wurde der Ansatz einer Ethanol-fällung unterworfen (Abschnitt 4. 2. 1. 1). Das trockene DNA-Pellet wurde in 4 µl Probenpuffer (1 Volumenanteil EDTA/Dextran-blau-Lösung + 5 Volumenanteile Formamid) aufgenommen, für 2 min auf 90°C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der DNA zu verhindern.

Elektrophorese und Detektion:

Die Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel erlaubt, im Gegensatz zum Agarosegel, eine Auftrennung von Fragmenten mit extrem geringen Größenunterschieden. Unter denaturierenden Bedingungen wandern die DNA-Fragmente aus den Sequenzierreaktionen im elektrischen Feld unterschiedlich schnell und werden nach ihrer Größe aufgetrennt.

Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wurden in einem Becherglas 30 g Harnstoff, 22 ml H₂O bidest (LiChrosolv[®], Merck), 10 ml 30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (29:1, Biorad) sowie 1 g Ionenaustauscher (Amberlite, Sigma) gegeben und bei 50°C gerührt, bis sich der Harnstoff gelöst hatte. Anschließend wurde der Ansatz durch einen Faltenfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert und zu dem Filtrat wurden 6 ml 10x TBE-Puffer, 15 µl TEMED sowie 350 µl 10 %ige APS-Lösung hinzugegeben. Unmittelbar darauf wurde das Gel gegossen und für ca. 2 h zur Polymerisation stehengelassen.

Die Elektrophorese und Detektion der fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente erfolgten mit Hilfe eines Sequenzierautomaten (373 DNA Sequencer Stretch, Applied Biosystems), in dem das auspolymerisierte Gel eingespannt wurde. Nach einer Vorlaufphase, die der Überprüfung des Gels diente, wurde der Elektrophoresepuffer (10x TBE) in die Pufferkammern gefüllt und das Gel mit den zuvor auf Eis gestellten Proben beladen. Für die Durchführung der Elektrophorese wurden die gemäß Herstellerangaben notwendigen Einstellungen am Gerät vorgenommen.

Die fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente wurden detektiert, sobald sie eine bestimmte Stelle im Gel passierten und von einem Laserstrahl zum fluoreszieren angeregt wurden. Das emittierte Fluoreszenzlicht fiel auf einen Photomultiplier, der die Lichtimpulse in elektrische Impulse umwandelte. Diese Impulse wurden dann an einen Macintosh Computer zur Prozessierung weitergeleitet. Durch die integrierte Software wurden die Signale direkt in eine DNA-Sequenz umgesetzt.

Die Sequenzanalyse am Sequenzierautomaten 373 DNA Sequencer Stretch (Applied Biosystems, USA) wurde eingesetzt, um die DNA-Sequenzen der aus dem Interaction Trap-System (siehe Abschnitt 4. 2. 2. 1) ermittelten Interaktoren zu bestimmen.

4. 2. 1. 13 Western-Blotting

Bei dem Western-Blotting oder Immuno-Blotting wird ein Proteingemisch zunächst in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei dissoziieren die Proteine durch die Wirkung der in der Probelösung sowie im Polyacrylamidgel enthaltenen SDS-Moleküle in ihre Untereinheiten und verlieren i. A. jegliche räumliche Struktur. Durch die Beladung mit SDS erhalten die Peptidketten eine stark negative Nettoladung, die die unterschiedlichen Eigenladungen kompensiert und umso stärker ist, je größer das Peptid ist. Bei der Elektrophorese werden diese SDS-beladenen Peptide nicht mehr nach Ladung, sondern nur noch nach Größe aufgetrennt. Im Anschluss an die Elektrophorese werden die Peptide durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese Membran wird mit einer Lösung eines ersten Antikörpers inkubiert, der spezifisch für das gesuchte Protein ist. Nach einem Wasch-Schritt wird die Membran anschließend mit einem enzymmarkierten zweiten Antikörper inkubiert, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet. Durch den Enzymanteil des zweiten Antikörpers kann die Position der immobilisierten Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurde das an den zweiten Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase zur Detektion von Proteinen verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation des Substrates Luminol unter Beteiligung von Wasserstoffperoxid, welches dabei als Oxidationsmittel fungiert. Die Reaktion hat eine Lichtemission im sichtbaren Bereich (428 nm) zur Folge. Diese enzymkatalysierte Chemilumineszenz wurde ausgenutzt, um einen Film zu belichten und somit die Proteinbanden (nach einem Entwicklungs- und Fixierprozess) sichtbar zu machen.

Zur Überprüfung der Expression der Bait-Fusionsplasmide im Interaction Trap-System wurden die nach Abschnitt 4. 2. 1. 2, Punkt 3 gewonnenen Lysate eingesetzt. Je 7,5 µl Lysat wurden mit 2,5 µl 4x Probenpuffer versetzt und für 3 min auf 96°C zur Denaturierung der Proteine erhitzt und vor dem Auftragen auf ein vertikales, 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel auf Eis gestellt. Das Gel wurde dabei nach folgendem Schema hergestellt (10 ml-Ansatz):

Komponente	Menge	
	Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid/0,8 % Bis-Acrylamid-Lösung (37,5:1)	4 ml	0,66 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	0,3 ml
10 % SDS	100 µl	50 µl
H ₂ Odest	3,3 ml	3,9 ml
TEMED	5 µl	5 µl
10 % APS	50 µl	25 µl

Nach dem Gießen und Auspolymerisieren des Trenn- und Sammelgels wurde das fertige Gel in die Elektrophoresekammer gestellt und 1x Laufpuffer hinzugegeben. Die Proben und der Molekulargewichtsmarker (je 5 µl) wurden appliziert und die Elektrophorese wurde gestartet. Dabei wurden für die Wanderung der Proteine durch das Gel folgende Einstellungen an der Stromquelle gewählt:

Sammelgel:	$U = 130 \text{ V}$, $I_{\text{max}} = 400 \text{ mA}$
Trenngel:	$U = 180 \text{ V}$, $I_{\text{max}} = 400 \text{ mA}$

Der Lauf wurde abgebrochen, nachdem die Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel und die Nitrocellulosemembran wurden nach der SDS-PAGE-Gelelektrophorese für einige Minuten in 1x Transferpuffer (+ 20 % Methanol) äquilibriert, während die Blotkammer vorbereitet wurde. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran (blotting) erfolgte in 1x Transferpuffer (+ 20 % Methanol) unter Kühlung bei 100 Volt und 400 mA (maximal eingestellter Wert) für 1½ h. Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran in Blockierlösung für 1 h inkubiert. Danach wurde die Blockierlösung verworfen und der Blot mit dem ersten Antikörper (Anti-LexA, 1:5000 in Blockierlösung verdünnt) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde anschließend in Waschpuffer für 10 min inkubiert, wobei der Waschpuffer mehrmals ausgetauscht wurde. Der Blot wurde dann mit dem zweiten Antikörper (Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Anti-Rabbit IgG, 1:2000 in Blockierlösung verdünnt) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend für 30 min in Waschpuffer inkubiert, wobei der Waschpuffer mehrmals ausgetauscht wurde. Danach wurde die Membran unter Zugabe von je 500 ml Luminol- und Oxidations-Reagenz (aus dem *Chemiluminescence Reagent*-Kit der Firma NEN, USA) in eine Klarsichtfolie eingewickelt und in einem Dunkelraum auf den Chemilumineszenz-Film gelegt. Daraufhin folgte die Filmentwicklung.

4. 2. 1. 14 Allgemeine Zellkulturtechnik

Die Zellen der Zelllinien LoVo, HeLa, Jurkat und 293-T wurden in Brutschränken bei 7 % CO₂, 37°C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Alle Zell-Kulturarbeiten erfolgten in Sterilbänken. Spätestens bei Erreichen der Konfluenz (100 %) wurden die Zellen passagiert und mit frischem Medium versorgt. Zur Lagerung wurden die Zellen in FKS,

supplementiert mit 10 % DMSO, aufgenommen und für 2 h bei -20°C aufbewahrt. Danach wurden sie in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt und dort gelagert. Zellzahlen wurden mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

4. 2. 1. 15 Transfektion von DNA in Zellen

Für die Bestimmung der zellulären Lokalisation von Ac-P35 und seinem Bindungspartner hRPB11 nach Abschnitt 4. 2. 2. 2 sowie für die Messung der Promoteraktivität nach Abschnitt 4. 2. 2. 3 wurden Zellen mit den entsprechenden Reporter- und Expressionskonstrukten (siehe Abschnitte 4. 1. 4. 3. 1 und 4. 1. 4. 3. 2) transfiziert. Dazu wurden Zellkulturen der in Abschnitt 4. 2. 1. 14 genannten Zelllinien zunächst solange in Kultur gehalten, bis sie eine Konfluenz von 60-80 % aufwiesen. Pro 150 mm-Zellkulturschale wurden dann - nach Absaugen des Mediums - vorsichtig 5 ml PBS-Lösung auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und durch je 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung ersetzt. Die mit Trypsin behandelten Zellen wurden dann für einige Minuten in den Brutschrank gestellt. Während dieser Zeit lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturplatten. Anschließend wurden die Zellsuspensionen zusammengeführt, in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, bei 1500 g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und in 10-20 ml Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die für die Transfektionen benötigte Anzahl Zellen aus der Suspension entnommen und erneut zentrifugiert (1500 g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde danach in einem definierten Volumen Medium aufgenommen. Das Gesamtvolumen des Mediums richtete sich nach der Anzahl der Transfektionen, wobei je Transfektionsansatz $2,5 \times 10^6$ Zellen (für Lokalisationsstudien) bzw. 10^6 Zellen (für Reporter-Assays) in einem Volumen von 400 μl eingesetzt wurden.

Lokalisationsstudien:

Pro Transfektionsansatz wurden 20 μg des Expressionsplasmids pEF/p35FLAG und 20 μg des Expressionsplasmids pCMV/hRPB11-GFP jeweils alleine oder zusammen (dann je 10 μg Plasmid) in HeLa-Zellen transfiziert oder ko-transfiziert. Dazu wurden entsprechende Mengen der Plasmidlösungen zunächst in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und mit H_2O bidest auf ein gleiches Volumen gebracht. Dann wurden je 400 μl Zellsuspension zugegeben und gemischt.

Anschließend wurden je 400 µl aus jedem Ansatz in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenabstand) überführt und bei einer Spannung von 230 V (Kapazität: 960 µF) elektroporiert (d.h. einem elektrischen Feld ausgesetzt, in dem sich ein Kondensator dieser Kapazität mit dieser Spannung durch die Zellsuspension hindurch entlud). Danach wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur stengelassen, in je 5 ml Medium überführt, vorsichtig durchmischt und zentrifugiert (1500 g, 5 min, RT). Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellpellets in je 3 ml Medium vorsichtig resuspendiert und auf 12-Well-Zellkulturplatten verteilt. Dabei wurden die Suspensionen einer jeden Transfektion in drei gleiche Volumina (je 1 ml) geteilt und jedes dieser Teilmengen in eine Vertiefung der Zellkulturplatte pipettiert (3-Fach-Bestimmung). Am Boden jedes dieser Vertiefungen wurde zuvor ein Mikroskopie-Deckgläschen gelegt, so dass sich die Zellen auf dem Deckgläschen absetzten. Anschließend wurden die transfizierten Zellen im Brutschrank für ~24 h inkubiert und nach Punkt 4. 2. 2. 2 weiterbehandelt.

Reporter-Assays:

Pro Transfektionsansatz wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Konstrukte 0,25-8 µg Reporterplasmid sowie bis zu 32 µg Expressionsplasmid in je ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Jeder Transfektionsansatz wurde mit einem Leervektor auf die gleiche DNA-Menge aufgefüllt und mit H₂O bidest auf ein gleiches Volumen gebracht. Auf die DNA-Lösungen wurden je 400 µl Zellsuspension gegeben und gemischt. Anschließend wurden je 400 µl aus jedem Ansatz in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenabstand) überführt und bei einer Spannung von 260 V (Kapazität: 960 µF) elektroporiert. Danach wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur stengelassen, in je 5 ml Medium überführt, vorsichtig durchmischt und zentrifugiert (1500 g, 5 min, RT). Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellpellets in je 2 ml Medium vorsichtig resuspendiert, auf 6-Well-Zellkulturplatten verteilt und für ca. 24 h inkubiert.

4. 2. 2 Spezielle Methoden der Molekularbiologie

4. 2. 2. 1 Das Interaction Trap-System

4. 2. 2. 1. 1 Theoretische Grundlagen

Das von Gyuris und Mitarbeitern entwickelte Interaction Trap-System (Gyuris et al, *Cell* 1993) ist eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen in vivo und beruht auf der Eigenschaft von Transkriptionsfaktoren, aus zwei funktionell unterschiedlichen und voneinander trennbaren Domänen zu bestehen.

Transkriptionsfaktoren wie z. B. Gal4 aus der Hefe besitzen zwei Funktionen: die erste Funktion besteht in der Bindung an spezifische (regulatorische) Sequenzen auf der DNA, während die zweite Funktion eine Erhöhung der Frequenz bewirkt, mit der die Transkription initiiert wird. Diese Funktionen werden von zwei entsprechenden Domänen bewirkt, der DNA-Bindungsdomäne und der Aktivierungsdomäne, wobei letztere vermutlich in Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase oder mit ihr assoziierter Proteine tritt (Luban and Goff, *Curr Opin Biotechn* 1995).

In Abb. 23 ist der Transkriptionskomplex, wie er sich an einem Promoter eines zu transkribierenden Gens zusammensetzt, schematisch dargestellt. Es ist die modulare Natur zweier Transkriptionsaktivatoren zu erkennen, die die Transkription stimulieren.

Die modulare Natur eukaryotischer Transkriptionsfaktoren konnte gezeigt werden durch die Konstruktion eines Hybridproteins, LexA-Gal4, bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne des *E. coli*-Repressorproteins LexA und der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 aus *S. cerevisiae* (Brent und Ptaschne, *Cell* 85). Dieses heterogene Hybridprotein löste in Hefezellen die Expression von Reportergenen aus, wenn die Reportergen-Konstrukte LexA-Operatorsequenzen stromaufwärts des Transkriptionsstarts (der Reportergene) enthielten (Die DNA-Bindungsaktivität wurde dabei von der LexA-Komponente, die aktivierende Funktion von der Gal4-Komponente des Hybridproteins LexA-Gal4 übernommen).

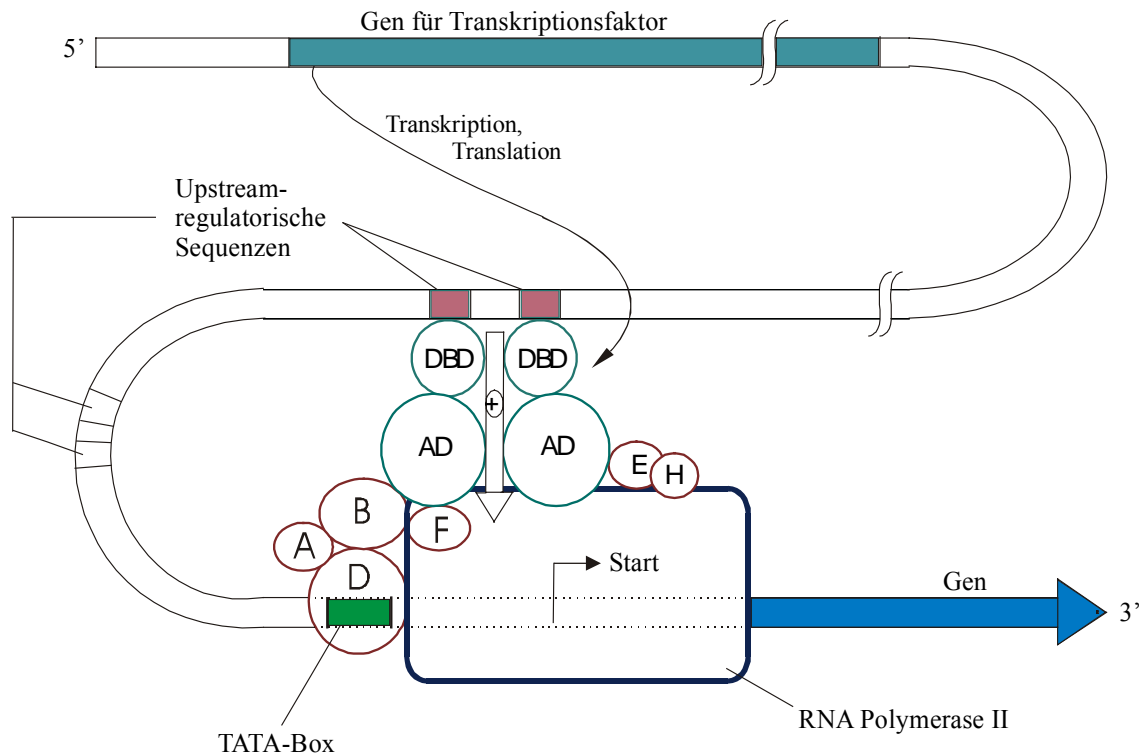


Abb. 23: Transkriptionskontrolle durch basale und nicht-basale Transkriptionsfaktoren (nach Koolmann, *Taschenatlas der Biochemie*, Thieme 1998)

Gezeigt ist der an einem eukaryotischen TATA-Box-Promoter gebundene RNA-Polymerase II-Initiationskomplex, bestehend aus der RNA-Polymerase II und den basalen Transkriptionsfaktoren (als A bis H bezeichnet). Weitere, nicht basale Transkriptionsfaktoren (DBD = DNA-Bindungsdomäne, AD = Aktivierungsdomäne) können die Transkription stimulieren, indem sie an stromaufwärtsgelegene Kontrollelemente (regulatorischen Sequenzen) binden und in Wechselwirkung mit dem basalen Komplex treten.

In *Saccharomyces cerevisiae* enthalten die meisten Gene nur einen regulatorischen Bereich, der als stromaufwärts von der Startstelle gelegene, aktivierende Sequenz (UAS = Upstream Activating Sequence) bezeichnet wird, und eine TATA-Box, die sich ca. 100 Basenpaare stromaufwärts von der Startstelle befindet (Lodish, *Molekulare Zellbiologie*, 1996).

Wurde in den Experimenten anstelle des Hybridproteins natives LexA-Protein eingesetzt, so fand keine Aktivierung der Reportergene statt.

Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass heterogene DNA-Bindungs-domänen und Aktivierungsdomänen über nicht-kovalente Protein-Protein-Interaktionen einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor bilden können (Ma und Ptaschne, *Cell* 1988).

Wegweisend für die Entwicklung des Interaction Trap-Systems waren die Arbeiten von Fields und Song, die im Jahre 1989 eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in vivo vorstellten (Fields and Song, *Nature* 1989). Diese als Two-Hybrid System bezeichnete Methode beruhte auf dem modularen Aufbau des Transkriptionsfaktors Gal4 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Es wurden zwei Hybridproteine generiert, wobei ein Hybrid-Protein aus der DNA-Bindungsdomäne von Gal4 und einem Protein X, das andere Hybridprotein aus der Aktivierungsdomäne von Gal4 und einem Protein Y bestand. Diese beiden Hybridproteine wurden in Hefezellen eingeführt. Eine Interaktion zwischen den Proteinen X und Y im Zellkern führte zur Wiederherstellung des Transkriptionsfaktors Gal4 und somit zur Transkription von einem Reportergen, das stromaufwärts vom Transkriptionsstart eine Bindungsstelle für Gal4 enthielt (Fields and Song, *Nature* 1989, Chien et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 1991).

Ebenso wie das Two-Hybrid System nutzt das Interaction Trap-System die modulare Struktur von Transkriptionsfaktoren aus. Die beiden Systeme unterscheiden sich hauptsächlich nur in der Wahl der Transkriptionsfaktoren und der Reportergene: während beim Two-Hybrid System die zwei Domänen des Transkriptionsfaktors Gal4 verwendet werden, wird beim Interaction Trap-System der bakterielle Repressor LexA als DNA-bindende Domäne bzw. das bakterielle Peptid B42 als Aktivierungsdomäne eingesetzt. Weiterhin werden die Reportergene LacZ und *HIS3* im Two-Hybrid-System verwendet, während die Reportergene LacZ und *LEU2* im Interaction Trap-System eingesetzt werden (Golemis et al in *Current Pr.*, 1997).

In Abb. 24 ist das Funktionsprinzip des Interaction Trap-Systems dargestellt:

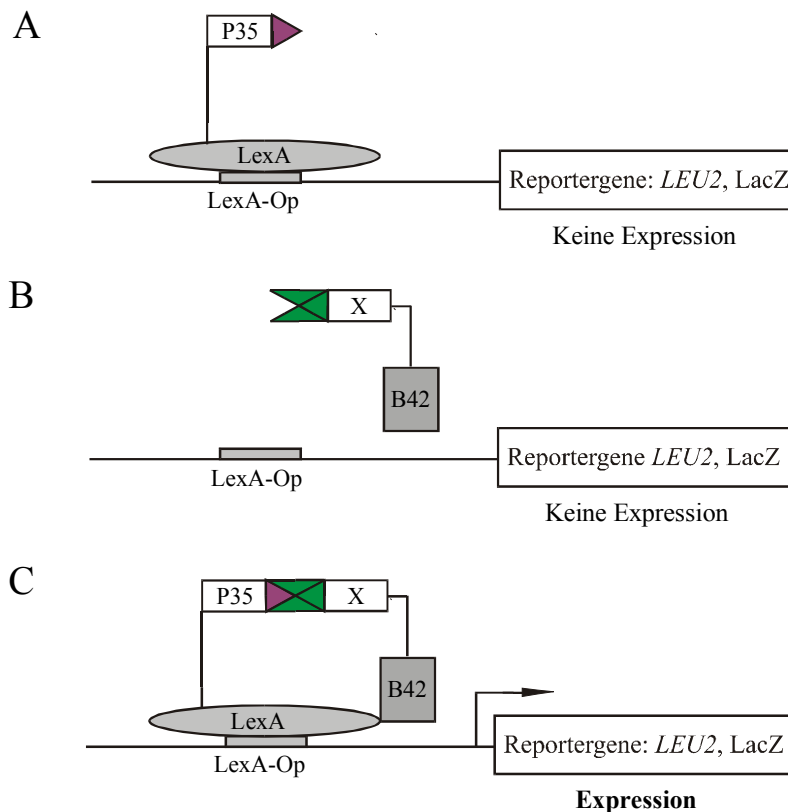


Abb. 24: Funktionsprinzip des Interaction Trap-Systems.

Gezeigt ist das Funktionsprinzip des Interaction Trap-Systems, wie es sich für eine einzige Hefezelle darstellt.

Es werden zwei verschiedene Fusions- bzw. Hybridplasmide konstruiert, die zur Expression der jeweiligen Hybridproteine in den Hefestamm *S. cerevisiae* EGY 48/pSH18-34 transformiert werden. In diesem Hefestamm stehen die Reportergene *LEU2* und *LacZ* unter der Kontrolle von mehreren LexA-Operator-Sequenzen, die stromaufwärts von diesen Genen liegen. Das chromosomale *LEU2*-Reportergen ist durch ein LexAop-*LEU2*-Konstrukt ersetzt worden, so dass sich anstelle der natürlichen regulatorischen Sequenzen vor dem *LEU2*-Gen 6 LexA-Operator-Bindungsstellen hoher Affinität befinden (Gyuris et al, 1993). In dem hochsensitiven Reporterplasmid pSH18-34 sind 8 LexA-Operator-Sequenzen 167 Basenpaare stromaufwärts des *LacZ*-Gens inkloniert worden (Golemis et al, in *Curr. Protocols in Molecular Biology* 1997).

Das eine Hybridprotein, das Fusionsprodukt LexA/p35, wird als „Bait (Köder)“ bezeichnet, während das andere Hybridprotein, das Fusionsprodukt B42/Protein X, „Prey (Beute)“ genannt wird. Das Protein X repräsentiert hierbei eines von einigen Millionen Proteinen aus einer Genbibliothek, die aus humanem Placenta Gewebe bzw. Jurkat Zellen gewonnen und in den Prey-Vektor pYESTrp inkloniert (vgl. Abschnitt 4. 1. 4. 1) wurde. Im Falle einer Interaktion zwischen p35 und dem Protein X im Zellkern werden zugleich das Protein LexA und das Peptid B42 zu einem funktionsfähigen Transkriptionsfaktor zusammengebracht. Durch den LexA-Anteil bindet dieser Transkriptionsfaktor an die LexA-Operator-Sequenzen stromaufwärts der Reportergene *LEU2* und *LacZ* im Zellkern der Hefezelle. Mit Hilfe der Aktivierungsdomäne B42 erfolgt die Transkription der beiden Reportergene. Die Aktivität des *LEU2*-Reportergens führt zur Produktion der Aminosäure Leucin und ermöglicht ein Wachstum der Hefezellen auf einem Leucin-Mangelmedium (UHWL-Medium), während die Transkription des Reportergens *LacZ* zur Expression des Enzyms β -Galactosidase führt, welches das im Medium befindliche farblose Lactosederivat X-Gal hydrolytisch zum blauen Indigofarbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo umsetzt.

4. 2. 2. 1. 2 Durchführung des Interaction Trap-Systems

Die Suche nach Interaktionspartnern von Ac-p35 und APAF-1 erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach dem Prinzip des Interaction Trap-Systems. Alle Arbeiten mit dem Hefestamm *S. cerevisiae* EGY/pSH18-34 wie die Transformation mit den Bait- und Prey-Plasmiden, die Gewinnung von Zelllysaten oder die Isolierung von Plasmid-DNA (s. u.), wurden unter Anwendung von Arbeitsvorschriften des *Hybrid Hunter™ Two Hybrid System*-Handbuches (Version A) der Firma Invitrogen durchgeführt. Das von Invitrogen vertriebene *Hybrid Hunter™ Two Hybrid System*, auf das sich das verwendete Handbuch bezieht, stellt eine modifizierte Version des Interaction Trap-Systems dar.

Am Beispiel des P35-Proteins aus *Autographa californica* sei die Suche nach Interaktionspartnern mit Hilfe des Interaction Trap-Systems schrittweise erläutert:

1. In drei Klonierungsschritten wird das Gen p35 von *Autographa californica* aus dem Plasmid pBlueskript/p35 in den Vektor pLexA202 kloniert; pLexA202 enthält Sequenzen, die für die Bindungsdomäne kodieren. Anschließend wird eine Sequenzanalyse (Abschnitt 4. 2. 1. 12) durchgeführt um sicherzustellen, dass der Leserahmen des Fusionsproduktes pLexA/p35 erhalten blieb.
2. Das Fusionsplasmid pLexA/p35 wird in den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* EGY 48, der das Reporterplasmid pJK103 enthält, transformiert. Nach der Transformation werden die Hefezellen auf UH⁻-Medium ausplattiert und bei 30°C für 3 Tage inkubiert, um auf den Erhalt des Bait-Plasmides zu selektionieren (siehe Tabelle in Abschnitt 4. 1. 10. 2).
3. Mittels Western-Blot (Abschnitt 4. 2. 1. 13) wird auf die Expression des Fusionsproteins LexA-P35 geprüft. Dazu werden die nach Punkt 2 erhaltenen Kolonien in UH⁻-Flüssigmedium über Nacht inkubiert und die Übernachtskulturen anschließend gemäß der Vorschrift für die Gewinnung der Zelllysate behandelt.
4. Durch Selektion auf die *LEU2*- und *LacZ*-Reporterogenaktivitäten wird das Bait-Plasmid pLexA/p35 auf unspezifische, transaktivierende Aktivität geprüft. Dazu werden die nach Punkt 2 erhaltenen Kolonien auf UHL⁻- und UHL⁻-X-Gal-Medium ausplattiert und bei 30°C für 5 Tage bei 30°C inkubiert.
5. *S. cerevisiae* EGY 48/pJK103/pLexA/p35 wird mit dem Vektor pYESTrp, der die Human Placenta- bzw. Jurkat-Genbibliothek enthält, transformiert. Dazu wird eine UH⁻-Flüssigkultur mit einer nach Punkt 2 erhaltenen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Dann folgt die Transformation mit pYESTrp, das Ausplattieren auf UHW⁻-Selektivmedium und die Inkubation bei 30°C für 3 Tage. Die verwendeten Genbanken

- enthalten mögliche Interaktionspartner für Ac-P35.
6. Die Transformanten aus 5. werden von ihren Nährmedien heruntergespült, gewaschen, aliquotiert und auf *LEU2*-Reportergenaktivität selektioniert, indem sie auf UHWL⁻Medium ausplattiert und für 5 Tage bei 30°C bebrütet werden. Einzelne Kolonien werden dann auf UHWL⁻-X-Gal-Medium ausplattiert und für 3 Tage bei 30°C bebrütet, um auf LacZ-Reportergenaktivität zu selektionieren. Wachstum auf UHWL⁻ - sowie zusätzlich Blaufärbungen einzelner Kolonien auf UHWL⁻-X-Gal-Medium deuten auf eine Interaktion zwischen Ac-P35 und einem Protein aus der Genbank hin.
 7. Um die Spezifität von Interaktionen zu überprüfen, wird die DNA der potentiellen Interaktionspartner in den aus 2. erhaltenen Hefestamm *S. cerev.* EGY 48/pJK103/ pLexA/p35 zurücktransformiert. Dazu werden die cDNA-Fragmente aus den blauen Hefekolonien zunächst mittels PCR und unter Verwendung der pYESTrp-spezifischen Primer YES-S und YES-AS amplifiziert (als Template für die Reaktion werden mit Hilfe einer Mikropipettenspitze Hefezellen von den Kolonien abgetragen und direkt zu dem Reaktionsansatz gegeben). Anhand der PCR-Banden werden Klone ausgewählt, aus denen die potentiellen Interaktoren isoliert werden sollen. Dabei wird darauf geachtet, dass möglichst viele unterschiedlich große PCR-Banden erfasst werden können, d. h. es wird versucht, ein möglichst breites Spektrum unterschiedlich langer PCR-Fragmente aus den Hefeklonen zu erfassen, um auch ein entsprechend breites Spektrum an potentiellen Interaktoren zu gewinnen. Von den nach diesen Kriterien selektierten Hefeklonen werden 1 ml-Übernachtskulturen in W-Medium angelegt, die bei 30°C inkubiert werden. In diesem Medium wird auf den Erhalt des Prey-Plasmids selektioniert, das die cDNA des jeweiligen potentiellen Interaktors trägt. Entsprechend der Vorschrift für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen werden die Hefezellen aus den Übernachtskulturen lysiert und aus den Lysaten wird die Plasmid-DNA extrahiert. Die so erhaltene DNA wird in je 10 µl H₂O bidest aufgenommen, und je 1 µl der DNA-Lösungen wird in kompetente *E. coli* DH5α elektroporiert (Abschnitt 4. 2. 1. 4). Aus den *E. coli*-Klonen, die die Interaktor-Plasmide aufgenommen haben (Nachweis erfolgt über PCR: einzelne Kolonien werden als Template direkt zu dem Reaktionsansatz gegeben) werden Minipräparationen gemacht, von denen jeweils 0,5-1 µg in den aus Punkt 2 erhaltenen Hefestamm *S. cerev.* EGY 48/pJK103/pLexA/p35 transformiert werden. Nach Wachstum auf UHW⁻-Medium erfolgt die Selektion auf Reportergenaktivität durch Ausplattieren auf UHWL⁻-und UHWL⁻-X-Gal-Medium, wobei für jeweils 3-5 Tage bei 30°C inkubiert wird. Gleichzeitig wird das Prey-Plasmid pJG4-5/GABI in den Hefestamm

Saccharomyces cerevisiae EGY 48/pJK103/Integrin β_7 , der das Reporterplasmid pJK103 sowie das Bait-Plasmid pLexA/Integrin β_7 enthält, transformiert. Nach Wachstum auf UHW⁻-Medium erfolgt ebenfalls die Selektion auf Reporterogenaktivität durch Ausplattieren auf UHWL⁻-und UHWL⁻-X-Gal-Medium. Die Interaktion zwischen den Fusions-proteinen B42/GABI und LexA/Integrin β_7 im Interaction Trap-System ist beschrieben worden (Rietzler et al., *J Biol Chem* 1998) und dient hier als Positiv-Kontrolle (vgl. Ergebnisteil).

8. Die DNA der nach 7. ermittelten Interaktionspartner wird nach Abschnitt 4. 2. 1. 12 sequenziert. Um eine Identifizierung zu ermöglichen, werden öffentlich zugängliche Gendatenbanken (etwa Genbank des National Institute of Health der USA) mit diesen Sequenzen unter Verwendung eines Suchalgorithmus (etwa Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) auf Sequenzen abgesucht, die zu den eingegebenen Interaktor-Sequenzen identisch bzw. ihnen ähnlich sind. Mit den auf diese Weise erhaltenen Informationen lassen sich Strategien für weitere Untersuchungen entwickeln.

4. 2. 2. 2 Lokalisationstudien

Um die zelluläre Lokalisation von Ac-P35 und seinem Bindungspartner hRPB11 (siehe Abschnitt 2. 1. 1) zu untersuchen, wurden die nach Abschnitt 4. 2. 1. 15 transfizierten Zellen ein oder zwei Tage nach Transfektion mit je 500 μ l PBS-Lösung gewaschen und immunzytologisch untersucht. Hierzu wurden die Präparate (die Zellen waren nach Transfektion auf Deckgläschen inkubiert worden) mit einer 2 %igen Formalinlösung (in PBS) für 20 min (RT) fixiert. Nach einem Wasch-Schritt mit 500 μ l PBS wurden die Zellen mit je 500 μ l PBS/0,5 % BSA-Lösung 2x gewaschen. Dann wurde erneut gewaschen, diesmal mit 500 μ l einer PBS/0,5 % BSA/0,5 % Saponin-Lösung. Anschließend wurden 500 μ l der Erst-Antikörperlösung (Lokalisation von Ac-P35: Anti-FLAG-Antikörper, 1:500 verdünnt in PBS/0,5 % BSA/0,5 % Saponin-Lösung, Lokalisation von hRPB11: kein Antikörper) hinzugegeben und für 30 min (RT) inkubiert. Nach zwei Wasch-Schritten mit je 500 μ l PBS/0,5 % BSA/0,5 % Saponin-Lösung wurde der Zweit-Antikörper (Lokalisation von Ac-P35: Cy3-konjugierter Anti-Maus-Antikörper, 1:500 verdünnt in PBS/0,5 % BSA/0,5 % Saponin-Lösung, Lokalisation von hRPB11: kein Antikörper) zugegeben und für 30 min (RT) inkubiert. Anschließend wurde ein zweifacher Wasch-Schritt mit

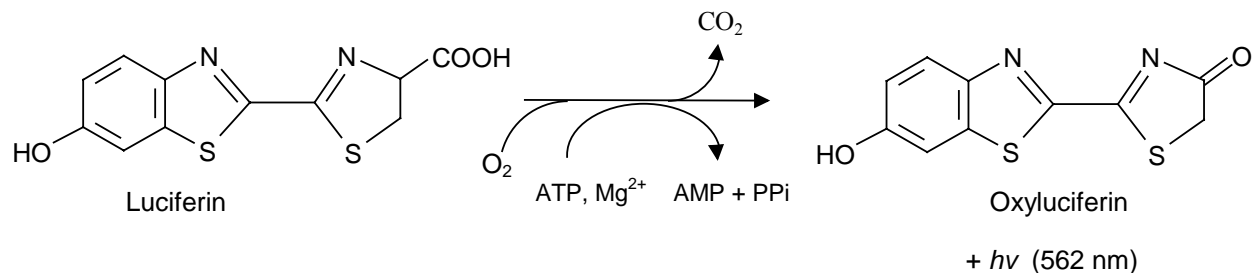
je 500 µl PBS/0,5 % BSA/0,5 % Saponin-Lösung durchgeführt. Im Anschluss daran wurde 1x mit 500 µl PBS/0,5 % BSA-Lösung gewaschen. Im letzten Schritt wurden 500 µl PBS-Lösung auf die Zellen gegeben. Mit einer Pinzette wurden die Deckgläschen mit den fixierten und gefärbten Zellen aus den Vertiefungen der 12-Well-Platte entnommen und seiten-verkehrt (Zellen zeigten nach unten) auf einen Objektträger gelegt, der zuvor mit einem Tropfen des Eindeckmittels Entellan[®] versetzt worden war. Der Objektträger mit den anhaftenden Zellen wurde dann für 30 min bei 37°C (Heizblock) getrocknet. Die Zellen waren nun bereit für die Fluoreszenz-Mikroskopie. Die mikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Ac-P35 und hRPB11 in diesen Zellen wurde mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Zeiss, Jena) durchgeführt.

4. 2. 2. 3 Das Luciferase Reporter-System

Um den Einfluss des P35-Proteins aus *Autographa californica* in An- und Abwesenheit des Bindungspartners hRPB11 auf die Transkription zu untersuchen wurde eine Methode eingesetzt, die als Reporter-System oder Reporter-Assay bezeichnet wird. Dabei wird die Fähigkeit eines Genprodukts untersucht, die Transkription eines Reportergens zu stimulieren. In dieser Arbeit wurden verschiedene eukaryotische Promotoren jeweils unmittelbar stromaufwärts des Glühwürmchen-Luciferase-Gens plaziert (d.h. das Luciferasegen stand unter der Kontrolle dieser Promotoren). Die Aktivität der Promotoren korreliert in solchen Konstrukten direkt mit der Expression der Luciferase, die wiederum sehr sensitiv nachgewiesen werden kann. Damit kann in diesem System der Einfluß experimentell applizierter Manipulationen (wie hier die Anwesenheit von P35) auf die Aktivität des jeweiligen Promotors untersucht werden. Das Reporterplasmid wurde zusammen mit Expressionsvektoren, in die zuvor die kodierenden Sequenzen von Acp35 oder hRPB11 kloniert worden waren, in menschliche Zellen eingeführt (s. o.). In den transfizierten Zellen konnten die exprimierten Proteine P35 und HRPB11, sofern sie einen Einfluss auf den eukaryotischen Promoter hatten, die Transkription des Luciferase-Gens stimulieren oder hemmen. In den Lysaten der transfizierten Zellen wurde die Aktivität des jeweilig untersuchten Promotors indirekt durch Messung der Reportergenaktivität bestimmt.

Messprinzip:

Der Messung der Reporterogenaktivität liegt die durch Luciferase katalysierte Umsetzung von Luciferin zugrunde. Dabei tritt das Phänomen der Biolumineszenz auf, welches für die Messung ausgenutzt wird. In Gegenwart von Luftsauerstoff wird das Substrat Luciferin in einer ATP-abhängigen Reaktion und in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen zu Oxyluciferin oxidiert, wobei eine Lichtemission erfolgt (durch Zerfall eines 1,2-Dioxetans, das als Zwischenprodukt auftritt und zu Oxyluciferin und CO_2 zerfällt). Diese Lichtemission ist proportional zur Luciferase-Konzentration, welche wiederum proportional zur Aktivität des vorgeschalteten Promoters ist. Die durch die Luciferase der Feuerfliege katalysierte Reaktion kann folgendermaßen zusammengefasst werden (nach Ibelgaufs, 1993 und Vollhardt, 1990):



Die Lichtemission wurde mit Hilfe eines Luminometers gemessen, wobei die auf einen Photomultiplier auftreffenden Photonen in Elektronen umgewandelt und als Einzelimpulse verstärkt wurden. Ein Computer zählte die Impulse, deren Gesamtzahl direkt der emittierten Lichtmenge – und somit indirekt der Enzymkonzentration – proportional war.

Probenvorbereitung:

Nach Inkubation der nach Abschnitt 4. 2. 1. 15 transfizierten Zellen wurden – nach Absaugen des Mediums – die Ansätze mit je 1 ml PBS gewaschen. Dazu wurde das PBS vorsichtig auf die Zellen gegeben und anschließend durch Absaugen entfernt. Danach wurden auf die Zellen je 500 μ l 1x-Lysepuffer (Promega, USA) gegeben, und die Ansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur stengelassen. Die lysierten Zellen wurden danach in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei $-70^\circ C$ für mindestens 1 h eingefroren. Nach dem Auftauen der Ansätze auf Raumtemperatur wurden diese für 2 min (12000 g, RT) zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend im Luminometer gemessen.

Messung:

Pro Messung wurden 20 µl Zellysatz in ein 5 ml-Rundbodenröhrchen überführt, in die Probenaufnahmevorrichtung des Luminometers gestellt und die Messung wurde per Knopfdruck gestartet. Dabei wurde in die Probelösung 100 µl Substrat-Lösung (aus dem *Luciferase Assay System*-Kit der Firma Promega) injiziert und die Lichtmenge der Reaktion bei einer eingestellten Messzeit von 10 Sekunden gemessen. Als Maßeinheit für die gemessenen Lichtimpulse wurden die sogenannten relativen Lichteinheiten (RLU = Relative Light Units) gewählt. Diese entstanden durch Division der direkt gezählten Impulse durch den Faktor zehn.

5 Literatur

Abbas, A. K. (1996). Die and let live: eliminating dangerous lymphocytes. *Cell* 84, 655-657.

Acker, J., de Graaff, M., Cheynel, I., Khazak, V., Kedinger, C., and Vigneron, M. (1997). Interactions between the human RNA polymerase II subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 16815-16821.

Adams, J. M. and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 61-66.

Adrain, C., Slee, E. A., Harte, M. T., Martin, S. J. (1999). Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 20855-20860.

Adrain, C. and Martin, S. J. (2001). The mitochondrial opoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 390-397.

Afford, S. and Randhawa, S. (2000). Demystified. Apoptosis. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 53, 55-63.

Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Wang, L., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1997). *Spodoptera frugiperda* caspase-1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is the target of the baculovirus antiapoptotic protein p35. *J Biol Chem* 272, 1421-1424.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D. *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage. VCH Verlag, 1995.

Alcami, A. and Koszinowski, U. H. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Molecular Medicine Today* 6, 365-372

Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signalling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Beidler, D. R., Tewari, M., Friesen, P. D., Poirier, G., and Dixit, V. M. (1995). The baculovirus p35 protein inhibits fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 16526-16528.

Bellamy, C. O. (1997). p53 and apoptosis. *Br Med Bull* 53, 522-538.

Benedict, M. A., Hu, Y., Inohara, N., Núñez, G. (2000). Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 8461-8468

Bertin, J., Mendrysa, S. M., LaCount, D. J., Gaur, S., Krebs, J. F., Armstrong, R. C., Tomaselli, K. J., and Friesen, P. D. (1996). Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. *Journal of Virology* 70, 6251-6259.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 7, 1513-1523.

Brent, R. and Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43, 729-736.

Bruno, T., Leonetti, C., Aloe, S., Iacobini, C., Floridi, A., Di Tondo, U., Punturieri, A., and fanciulli, M. (1998). Levels of expression of hRPB11, a core subassembly subunit of human RNA polymerase II, affect doxorubicin sensitivity and cellular differentiation. *FEBS Letters* 427, 241-246.

Bruno, T., Corbi, N., Di Padova, M., De Angelis, R. Floridi, A., Passananti, C., Fanciulli, M. (1999). The RNA polymerase II core subunit 11 interacts with keratin 19, a component of the intermediate filament proteins. *FEBS Letters* 453, 273-277.

Bryant, N. J. and Stevens, T. H. (1998). Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 230-247.

Bump, N. J., Hacket, M., Hugunin, M., Seshagari, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., Licari, P., Mankovich, J., Shi, L., Greenberg, A. H., Miller, L. K., and Wong, W.W. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269, 1885-1883.

Buratowski, S. (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77, 1-3.

Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C., Cohen, G. M. (1999). caspase activation involves the formation of the aposome, a large (~700 kDa) caspase-activating complex. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 22686-22692.

Cain, K., Bratton, B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X-M., Cohen, G. M. (2000). *The Journal of Biological Chemistry* 275, 6067-6070.

Carstens, E. B., Tjia, S. T., Doerfler, W. (1979). Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. I. Synthesis of intracellular proteins after virus infection. *Virology* 99, 386-398.

Cartier, J. L., Hershberger, P. A., and Friesen, P. D. (1994). Supression of apoptosis in insect cells stably transfected with baculovirus p35: dominant interference by N-terminal sequences p35¹⁻⁷⁶. *Journal of Virology* 68, 7728-7737.

Chen, L. M., Kaniga, K., and Galan, J. E. (1996). *Salmonella spp.* are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* 21, 1101-1115.

Cheong, J. H., Yi, M., Lin, Y., and Murakami, S. (1995). Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *EMBO* 14, 143-150.

Chernajovski, Y., Kimchi, A., Schmidt, A., Zilberstein, A., and Revel, M. (1979). Differential effects of two interferon-induced translational inhibitors on initiation of protein synthesis. *Eur. J. Biochem.* 96, 35-41.

- Chien, C-T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9578-9582.
- Choder, M., and Young, R. A. (1993). A portion of RNA polymerase II molecules has a component essential for stress response and stress survival. *Mol Cell Biol* 13, 6984-6991.
- Clarke, P. G. (1990). developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181, 195-213.
- Clem, R. J., Fechheimer M., and Miller, L. K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-1390.
- Clem, R. J. and Miller, L. K. (1994). Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Molecular and Cellular Biology* 14, 5212-5222.
- Clem, R. J. (2001). Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death and Differentiation* 8, 137-143.
- Clifton, D. R., Goss, R. A., Sahni, R. A., van Antwerp, D., Baggs, R. B., Marder, V. J., Silverman, V. J., and Sporn, L. A. (1998). NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4646-4651.
- Collins, M. (1995). Potential roles of apoptosis in viral pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 152, 20-24.
- Cowles, C. R., Snyder, W. B., Burd, C. G. Emr, S. D. (1997). Novel golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *The EMBO Journal* 16, 2769-2782.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M. David, P. R., Kornberg, R. D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288, 640-648.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Ångstrom resolution. *Science* 292, 1863-1876.
- Darsow, T., Burd, C. G., and Emr, S. D. (1998). Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE. *J Cell Biol* 142, 913-922.
- Darsow, T., Katzmann, D. J., Cowles, C. R., Emr, S. D. (2001). Vps41p function in the alkaline phosphatase pathway requires homo-oligomerization and interaction with AP-3 through two distinct domains. *Molecular Biology of the Cell* 12, 37-51.
- Datta, R., Kojima, H., Banach, D., Bump, N. J., Talanian, R. V., Alnemri, E. S., Weichselbaum, R. R., Wong, W. W., and Kufe, D. W. (1997). Activation of a CrmA-insensitive, p35-sensitive pathway in ionizing radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 1965-1969.
- Dean, D., and Powers, V. C. (2001). Persistent *Chlamydia trachomatis* infections resist apoptotic stimuli. *Infect Immun* 69, 2442-2447.

Dela Cruz, W. P., Friesen, P. D., and Fisher, A. J. (2001). Crystal structure of baculovirus P35 reveals a novel conformational change in the reactive site loop after caspase cleavage. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 32933-32939.

Dequard-Chablat, M., Riva, M., Carles, C., and Sentenac, A. (1991). RPC19, the gene for a subunit common to yeast RNA polymerases A (I) and C (III). *J Biol Chem* 266, 15300-15307.

Dobos, P., and Cochran, M. A. (1980). Protein synthesis in cells infected by *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (Ac-NPV): the effect of cytosine arabinoside. *Virology* 103, 446-464.

Du, Q., Lehavi, D., Faktor, O., Qi, Y., and Chejanovsky, N. (1999). Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* 73, 1278-1285.

Du, X. and Thiem, S. (1997). Responses of insect cells to baculovirus infection: protein synthesis shutdown and apoptosis. *Journal of Virology* 71, 7866-7872.

Ebright, R. H. and Busby, S. (1995). The *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit: structure and function. *Curr Opin Genet Dev* 5, 197-203.

Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.

Elmore, L. W., Hancock, A. R., Chang, S. F., Wang, X. W., Chang, S., Callahan, C. P., Geller, D. A., Will, H., and Harris, C. C. (1997). Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14707-14712.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Estojak, J., Brent, R., and Golemis, E. A. (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol Cell Biol* 15, 5820-5829.

Fan, T., Lu, H., Hu, H., Shi, L., McClarty, G. A., Nance, D. M., Greenberg, A. H., and Zhong, G. (1998). Inhibition of apoptosis in *Chlamydia*-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med* 187, 487-496.

Fanciulli, M., Bruno, T., Cerboni, C., Bonetto, F., Iacobini, C., Frati, L., Piccoli, M., Floridi, A., Santoni, A., Punturieri, A. (1996). Cloning of a novel human RNA polymerase II subunit downregulated by doxorubicin: new potential mechanisms of drug related toxicity. *FEBS Letters* 384, 48-52.

Fanciulli, M., Bruno, T., Di Padova, M., De Angelis, R., Lovari, S., Floridi, A., and Passananti, C. (1998). The interacting RNA polymerase II subunits, hRPB11 and hRPB3, are coordinately expressed in adult human tissues and down-regulated by doxorubicin. *FEBS letters* 427, 236-240.

- Fanciulli, M., Bruno, T., Di Padova, M., De Angelis, R., Iezzi, S., Iacobini, C., Floridi, A., and Passananti, C. (2000). Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb. *The FASEB Journal* 14, 904-911.
- Farrow, S. N., White, J. H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K. T., Grinham, C. J., Martinou, J. C., and Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731-733.
- Fields, S., and Song, O.-K. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Fisher, A. J., dela Cruz, W., Zoog, S. J., Schneider, C. L., and Friesen, P. D. (1999). Crystal structure of baculovirus P35: role of a novel reactive site loop in apoptotic caspase inhibition. *The EMBO Journal* 18, 2031-2039.
- Friesen, P. D., and Miller, L. K. (1987). Divergent transcription of early 35- and 94-kilodalton protein genes encoded by the *HindIII*-K genome fragment of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 61, 2264-2272.
- Fuchs, L. Y., Woods, M. S., and Weaver, R. F. (1983). Viral transcription during *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection: a novel RNA polymerase induced in infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J Virol* 48, 641-646.
- Gastmann, B. R. (2001). Apoptosis and its clinical impact. *Head & Neck* 23, 409-425.
- Golemis, E. A., Serebriiskii, Gyuris, J., and Brent, R. (1997). Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. In *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidmann, J. A. Smith and K. Struhl, eds (John Wiley & Sons), 20.1.1-20.1.35.
- Golemis, E. A., Serebriiskii, I., and Law, S. F. (1999). The yeast two-hybrid system: criteria for detecting physiologically significant protein-protein interactions. *Curr Iss Mol Biol* 1, 31-45.
- Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., and McCawley, P. (1978). Gypsy moth cell lines divergent in viral susceptibility. *In Vitro* 14, 485-494.
- Gottlieb, R. A. (2001). Mitochondria and apoptosis. *Biological Signals and Receptors* 10, 147-161.
- Gottlob K., Fulco M., Levrero M., and Graessmann A. (1998). The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase-3 activity. *J Biol Chem* 273, 33347-33353.
- Gourse, R. L., Ross, W., and Gaal, T. (2000). UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol* 37, 687-695.
- Green, D. R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102, 1-4.
- Green, D. R., and Beere, H. M. (2001). Apoptosis. Mostly dead. *Nature* 412, 133-135.

- Grula, M. A., Buller, P. L., and Weaver, R. F. (1981). Alpha-amanitin resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus-infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperda* cells. *J Virol* 38, 916-921.
- Guzo, D., Rathburn, H., Guthrie, K., and Dougherty, E. (1992). Viral and host cellular transcription in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected gypsy moth cell lines. *Journal of Virology* 66, 2966-2972.
- Gyuris, J. Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75, 791-803.
- Häcker, G. (1999). Die physiologie des Zelltodes. *Die Medizinische Welt* 50, 294-301.
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301, 5-17
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S. A., Lowe, S. W., Penninger, J. M., and Mak, T. W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-352.
- Hay, B. A., Wolff, T., and Rubin, G. M. (1994). Expression of baculovirus p35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* 120, 2121-2129.
- Hay, B. A., Wassarman, D. A., and Rubin, G. M. (1995). *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 83, 1253-1262.
- Helling, R. B., Goodman, H. M., and Boyer, H. W. (1974). Analysis of endonuclease R-*EcoRI* fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 14, 1235-1244.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hershberger, P. A., LaCount, D. J., and Friesen, P. D. (1994). The apoptotic supressor P35 is required early during baculovirus replication and is targeted to the cytosol of infected cells. *Journal of Virology* 68, 3467-3477.
- Hinshaw, V. S., Olsen, C. W., Dybdahl-Sissoko, and Evans, D. (1994). Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J Virol* 68, 3667-3673.
- Honing, S., Sandoval, I. V., and von Figura, K. (1998). A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *The EMBO Journal* 17, 1304-1314.
- Hsu, H. Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-activation. *Cell* 81, 495-504.
- Ibelgaufts, H. *Gentechnologie von A bis Z*. VCH, 1993.
- Ishiguru, A., Kimura, M., Yasui, K., Iwata, A., Ueda, S., and Ishihama, A. (1998). Two large subunits of the fission yeast RNA polymerase II provide platforms for the assembly of small subunits. *J Mol Biol* 279, 703-712

- Ishihama, A. (1993). Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J Bacteriol* 175, 2483-2489.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., and Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8, 1693-1696.
- Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M. C. (1997). *Cell* 88, 347-354.
- Jiang, X., and Wang, X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9-activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 275, 31199-31203.
- Kalpana, G. V., and Goff, S. P. (1993). Genetic analysis of homomeric interactions of human immunodeficiency virus type 1 integrase using the yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10593-10597.
- Keaveney, M., and Struhl, K. (1998). Activator-mediated recruitment of the RNA polymerase II machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast. *Mol Cell* 1, 917-924.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Kim, H., Lee, H., and Yun, Y. (1998). X-gene product of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *J Biol Chem* 273, 381-385.
- Kimura, M., Ishiguro, A., and Ishihama, A. (1997). RNA polymerase II subunits 2, 3, and 11 form a core subassembly with DNA binding activity, *J Biol Chem* 272, 25851-25855.
- King, L. B., and Ashwell, J. D. (1994). Thymocyte and T cell apoptosis: is all death created equal?. *Thymus* 23, 209-230.
- Kleinig, H und Sitte, P. VEB Gustav Fischer Verlag, 1984.
- Koolmann, J. und Röhm, K-H. Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, 1998
- LaCount, D. J. and Friesen, P. D. (1997) Role of early and late replication events in induction of apoptosis by baculoviruses. *Journal of Virology* 71, 1530-1537.
- Lagasse, E., and Weissman, I. L. (1994). Bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages. *J Exp Med* 179, 1047-1052
- Langelier, M-F., Forget, D., Rojas, A., Porlier, Y., Burton, Z. F., and Coulombe, B. (2001). Structural and functional interactions of transcription factor (TF) IIA with TFIIE and RFIIIF in transcription initiation by RNA polymerase II. *J Biol Chem*
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.

- Lockshin, R. A., and Williams, C. M., (1965). Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 11, 803-809.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P. und Darnell, J. *Molekulare Zellbiologie*. 2. Auflage. De Gruyter, 1996.
- Los, M., Stroh, C., Jänicke, R. U., Engels, I. H., and Schulze-Osthoff, K. (2001). *Trends in Immunology* 22, 31-34.
- Luban, J., and Goff, S. P. (1995). The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions. *Curr Opin Biotechnol* 6, 59-64.
- Ma, J., and Ptashne, M. (1988). Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* 55, 443-446.
- Martin, S. J. (2001). Dealing the CARDs between life and death. *Trends Cell Biol* 11, 188-189.
- Martindale, D. W. (1990). A conjugation-specific gene (*cnjC*) from *Tetrahymena* encodes a protein homologous to yeast RNA polymerase subunits (RPB3, RPC40) and similar to a portion of the prokaryotic RNA polymerase alpha subunit (*rpoA*). *Nucleic Acid Res* 18, 2953-2960
- Mathews, C. K., van Holde, K. E. *Biochemistry*. The Benjamin Cummings Publishing Company, 1990.
- Matthews, R. E. F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the international committee on taxonomy of viruses. Karger, Basel.
- McClintock, J. T., Dougherty, E. M., and Weiner, R. M. (1986). Semipermissive replication of a nuclear polyherosis virus of *Autographa californica* in a gypsy moth cell line. *J Virol* 57, 197-204.
- McVey Ward, D., Radisky, D., Scullion, M. A., Tuttle, M. S., Vaughn, M., and Kaplan, J. (2001). hVPS41 is expressed in multiple isoforms and can associate with vesicles through a RING-H2 finger motif. *Exp Cell Res* 267, 126-134.
- Miller, L. K. (1997). Baculovirus interaction with host apoptotic pathways. *Journal of Cellular Physiology* 173, 178-182.
- Mitobe, J., Mitsuzawa H., and Ishihama, A. (2001). Functional analysis of RNA polymerase II Rpb3 mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 39, 210-221.
- Mittl, P. R. E., Di Marco, S., Krebs, J. F., Bai, X., Karanewsky, D. S., Priestle, J. P., Tomaselli, K. J., and Grütter, M. G.. (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide Acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J Biol Chem* 272, 6539-6547.
- Mizushima S, Nagata S.(1990). pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 18: 5322.
- Monack, D. M., Mecsas, J., Ghori, N., and Falkow, S. (1997). *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 10385-10390.

- Monack, D. M., Meccas, J., Bouley, D., and Falkow, S. (1998). *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. *J Exp Med* 188, 2127-2137.
- Monack, D. M., Hersh, D., Ghorri, N., Bouley, D., Zychlinsky, A., and Falkow, S. (2000). *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J Exp Med* 192, 249-258.
- Moriishi, K., Huang, D. C. S., Cory, S., and Adams, J. M. (1999). Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9683-9688.
- Morishima, N., Okano, K., Shibata, T., and Maeda, S. (1998). Homologous P35 proteins of baculoviruses show distinctive anti-apoptotic activities which correlate with the apoptosis-inducing activity of each virus. *FEBS Letters* 427, 144-148.
- Morris, T. D., and Miller, L. K. (1992). Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines. *Journal of Virology* 66, 7397-7407.
- Morris, T. D., and Miller, L. K. (1993). Characterization of productive and non-productive AcMNPV infection in selected insect cell lines. *Virology* 197, 339-348.
- Mülhardt, C. *der Experimentator: Molekularbiologie*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, 2000.
- Müller, A. and Rudel, T. (2001). Modification of host cell apoptosis by viral and bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 291, 197-207.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Nakamura, N., Hirata, A., Ohsumi, Y., and Wada, Y. (1997). Vam2/Vps41p and Vam6/Vps39p are components of a protein complex on the vacuolar membranes and involved in the vacuolar assembly in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272, 11344-11349.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., and Smith, T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371, 297-300.
- Nicholson, D. W. (2001). Baiting death inhibitors. *Nature* 410, 33-34.
- Nissen, M. S., and Friesen, P. D. (1989). Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene. *J Virol* 63, 493-503.
- Ooi, B. G. and Miller, L. K. (1988). Regulation of host RNA levels during baculovirus infection. *Virology* 166, 515-523.
- Passarge, E. *Taschenatlas der Genetik*. Georg Thieme Verlag, 1994.
- Pati, U. K., and Weissman, S. M. (1990). The amino acid sequence of the human RNA polymerase II 33-kDa subunit hRPB33 is highly conserved among eukaryotes. *J Biol Chem* 265, 8400-8403.
- Pati, U. K. (1994). Human RNA polymerase II subunit hRPB14 is homologous to yeast RNA polymerase I, II, and III subunits (AC19 and RPB11) and is similar to a portion of the bacterial RNA polymerase alpha subunit. *Gene* 145, 289-292.

- Price, A., Wickner, W., and Ungermann, C. (2000). Proteins needed for vesicle budding from the golgi complex are also required for the docking step of homotypic vacuole fusion. *J Cell Biol* 148, 1223-1229
- Purring-Koch, C., and McLendon, G. (2000). Cytochrome c binding to Apaf-1: the effects of dATP and ionic strength. *PNAS* 97, 11928-11931.
- Qi, X. M., He, H., Zhong, H., and Distelhorst, C. W. (1997). Baculovirus p35 and Z-VAD-fmk inhibit thapsigargin-induced apoptosis of breast cancer cells. *Oncogene* 15, 1207-1212.
- Radisky, D. C., Snyder, W. B., Emr, S. D., and Kaplan, J. (1997). Characterization of VPS41, a gene required for vacuolar trafficking and high-affinity iron transport in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 5662-5666.
- Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., Hockenberry, D., Korsmeyer, S., and White, E. (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 7742-7746.
- Rehling, P., Darsow, T., Katzmann, D. J., and Emr, S. D. (1999). Formation of AP-3 transport intermediates requires Vps41 function. *Nat Cell Biol* 1, 346-353.
- Resnicoff, M., Valentinis, B., Herbert, D., Abraham, D., Friesen, P. D., Alnemri, E. S., and Baserga, R. (1998). The baculovirus anti-apoptotic p35 protein promotes transformation of mouse embryo fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 10376-10380.
- Rietzler, M., Bittner, M., Kolanus, W., Schuster, A., and Holzmann, B. (1998). The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of β 7-integrins. *J Biol Chem* 273, 27459-27466.
- Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., and Gourse, R. L. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262, 1407-1413.
- Rubin, L. L. (1997). Neuronal cell death: when, why, and how. *Br Med Bull* 53, 617-631.
- Rubin, M. A., Mucci, N. R., Figursky, J., Fecko, A., Pienta, K. J., and Day, M. L. (2001). E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. *Hum Pathol* 32, 690-697.
- Ruiz-Vela, A., Albar, J. P., and Martínez-A, C. (2001). Apaf-1 localization is modulated indirectly by Bcl-2 expression. *FEBS Letters* 501, 79-83.
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R., and Alnemri, E. S. (1999). Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9-activation. *J Biol Chem* 274, 17941-17945.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor laboratory Press, 2001.
- Sanders, E. J., and Wride, M. A. (1995). Programmed cell death in development. *Int Rev Cytol* 163, 105-173.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.

Sarin, A., Williams, M. S., Alexander-Miller, M. A., Berzofsky, J. A., Zacharchuk, C. M., and Henkart, P. A. (1997). Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity* 6, 209-215.

Schneider U., Schwenk H. U., Bornkamm G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19, 621-626.

Shi, L., Mai, S., Israels, S., Browne, K., Trapani, J. A., and Greenberg, A. H. (1997). Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear lokalisation. *J Exp Med* 185, 855-866.

Smith, K. G. C., Strasser, A., and Vaux, D. L. CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/Apo-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *The EMBO Journal* 15, 5167-5176.

Sondeck, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1997). Crystal structure of a Ga protein bg dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379, 369-374.

Song, H. Y., Dunbar, J. D., Donner D. B. (1994). Aggregation of the intracellular domain of the type 1 tumor necrosis factor receptor defined by the two-hybrid system. *J Biol Chem* 269, 22492-22495.

Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, 1, 949-957.

Stewart, S. A., Poon, B., Jowett, J. B., and Chen, I. S. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *J Virol* 71, 5579-5592.

Struhl, K. (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* 98, 1-4.

Sugimoto, A., Friesen, P. D., and Rothman, J. H. (1994). Baculovirus p35 prevents developmentally programmed cell death and rescues a ced-9 mutant in the nematode *caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 13, 2023-2028.

Tata, J. R. (1966). Requirement for RNA and proteinsynthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev Biol* 13, 77-94.

Terradillos, O., Billet, O., Renard, C. A., Levy, R., Molina, T., Briand, P., and Buendia, M. A. (1997). The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene* 14, 395-404.

Thomson, B. J. (2001). Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol* 82, 65-76.

Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Tjian, R., and Maniatis, T. (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77, 5-8.

Vaux, D. L., Häcker, G., and Strasser, A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76, 777-779.

Vaux, D. L., and Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 2239-2244.

Vaux, D. L. (1997). CED-4 – the third horseman of apoptosis. *Cell* 90, 389-390.

Vier, J., Fürmann, C. and Häcker, G. (2000). Baculovirus P35 protein does not inhibit caspase-9 in a cell-free system of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276, 855-861.

Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsbiologie der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Solothurn, Jent und Gassmann, Solothurn, Switzerland, pp 130.

Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., and Hammill, L. D. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 β -converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78, 343-352.

Warner, T. S., Sinclair, D. A. R., Fitzpatrick, K. A., Sing, M., Devlin, R. H., and Honda, B. M. (1998). The light gene of *Drosophila melanogaster* encodes a homologue of VPS41, a yeast gene involved in cellular protein trafficking. *Genome* 41, 236-243.

Woychik, N. A., and Young, R. A. (1990). RNA polymerase II: subunit structure and function. *TIBS* 15, 347-351.

Woychik, N. A., Lane, W. S., Young, R. A. (1991). Yeast RNA polymerase II subunit RPB9 is essential for growth at temperatures extremes. *J Biol Chem* 266, 19053-19055.

Woychik, N. A., McKune, K., Lane, W. S., and Young, R. A. (1993). Yeast RNA polymerase II subunit RPB11 is related to a subunit shared by RNA polymerase I and III. *Gene Expr* 3, 77-82.

Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation *Nature* 284, 555-556.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.

Xu, G., Cirilli, M., Huang, Y., Rich, R. L., Myszka, D. G., and Wu, H. (2001). Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/P35 complex. *Nature* 410, 494-497

Xue, D. and Horvitz, R. (1995). Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 377, 248-251.

Yao, X. J., Mouland, A. J., Subbramanian, R. A., Forget, J., Rougeau, N., Bergeron, D., and Cohen, E. A. (1998). Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1-infected dividing Jurkat T cells. *J Virol* 72, 4686-4693.

Yonish-Rouach, E. (1996). The p53 tumour suppressor gene: a mediator of a G1 growth arrest and of apoptosis. *Experientia* 52, 1001-1007.

Yoshida, H., Kong, Y-Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J. M., and Mak, T. W. (1998). Apaf 1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 94, 739-750.

Young, K. H. (1998). Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time...*Biol Reprod* 58, 302-311.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., et al. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.

Zhang, G., and Darst, S. A. (1998). Structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit amino-terminal domain. *Science* 281, 262-265.

Zhou, Q., Krebs, J. F., Snipas, S. J., Price, A., Alnemri, E. S., Tomaselli, K. J., and Salvesen, G. (1998). Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry* 37, 10757-10765.

Zoog, S. J., Bertin, J., and Friesen, P. D. (1999). Caspase inhibition by baculovirus P35 requires interaction between the reactive site loop and the β -sheet core. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 25995-26002.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An Apaf-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.

Zychlinski, A., Prevost, M. C., and Sansonetti, P. J. (1992). *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358, 167-169.

Zychlinski, A., Thirumalai, K., Arondel, J., Cantey, J. R., Aliprantis, A. O., and Sansonetti, P. J. (1996). in vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infect Immun* 64, 5357-5365.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name: Takramah, David
Geburtsdatum/-ort: 21.04.1966, Potsdam
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1972 – 1976 Internationale Grundschule in Tema, Ghana
1976 – 1978 Paul-Schneider-Grundschule, Berlin
1978 – 1985 Askanische Oberschule, Berlin

Auslandsaufenthalt

1980 - 1981 Ghana
Besuch der Tema Secondary High School

Hochschulausbildung:

1986 - 1987 Studiengang: Biologie/Englisch,
1988 - 1989 Studiengang: Chemie,
1989 – 1996 Studiengang: Lebensmittelchemie an der Technischen
Universität Berlin

1997 □ □ **Abschluß: Staatlich Geprüfter
Lebensmittelchemiker**

Berufspraktikum

1996 - 1997 □ □ **Praktisches Jahr im Staatlichen Veterinär-und
Lebensmitteluntersuchungsamt Potsdam**

Berufstätigkeit:

01.10. 1997 – 30.04. 2001 □ □ **Doktorand** am Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums Rechts der
Isar der Technischen Universität München

München, den 06. 12. 2001